Funktion und Eigenschaften der Glykophosphatidylinositol-spezifischen Phospholipase C von Trypanosoma brucei

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von

Roland Bülow
aus Bremen

1987

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543904_0038

Funktion und Eigenschaften der Glykophosphatidylinositol-spezifischen Phospholipase C von Trypanosoma brucei

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von

Roland Bülow
aus Bremen

1987

Tag der mündlichen Prüfung: 3. April 1987

Dekan : Prof. Dr. Wolf Engels

1. Berichterstatter : Prof. Dr. Peter Overath

2. Berichterstatter : Prof. Dr. Volkmar Braun

Die vorliegende Arbeit wurde zwischen Mai 1984 und Januar 1987 am Max-Planck-Institut für Biologie in Tübingen angefertigt. Teile der Ergebnisse wurden in FEBS Letters 187, 105-110 (1985), J.Biol.Chem. 261, 11918-11923 (1986) und NATO ASI series on "Host-parasite cellular and molecular interactions in protozool infections" (1987) veröffentlicht.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. P. Overath für Themenstellung, Arbeitsplatz, viele hilfreiche Diskussionen und motivierende Anregungen.

Allen Mitarbeitern der Abteilung Overath möchte ich für die freundschaftliche Zusammenarbeit danken, insbesondere Christina Nonnengäßer.

Herrn Dr. H. Schwarz und Dr. J.K. Wright danke ich für viele hilfreiche Diskussionen und Anregungen.

In der vorliegenden Arbeit wurden fogende Abkürzungen verwendet:

cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CCA	Citrat und cis-Aconitat
cDNA	complementäre Desoxyribonukleinsäure
CGA	Citrat-Antikoagulans
CHO	Kohlenhydratseitenkette
cpm	counts per minute = gezählte Zerfälle pro Minute
CRD	crossreacting determinant = kreuzreagierende Determinante
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GPI-PLC	Glykophosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C
HEPES	N-2-Hydroxyehtylpiperazin-N´-2-hydroxypropansulfonsäure
IgG	Gamma-Immunglobulin
i.d.	intradermal
iFCS	inaktiviertes, foetales Kälberserum
i.m.	intramuskulär
i.p.	intraperitoneal
iPS	inaktiviertes Pferdeserum
kb	Kilo-Basen
kDNA	Kinetoplasten-DNA
KPP	Kaliumphosphatpuffer
mRNA	messenger RNA
medRNA	mini exon derived RNA = Transkript des mini exon
mfVSG	membrane form VSG = membrangebundenes VSG
NAD^+	Nicotinamid-Adenosin-Dinukleotid
NADH	Nicotinamid-Adenosin-Dinukleotid, reduzierte Form
NaPP	Natriumphosphatpuffer
pCMBS	para-Chloromercuribenzenesulfonic acid
PBS	Phopshatgepufferte Saline
PDE	Phosphodiesterase
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SB	Seperation-Buffer
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sVSG	soluble VSG = lösliches VSG
TCA	Trichloressigsäure
TDB	Trypanosome Dilution Buffer = Trypanosomenpufferr
TLCK	p-Tosyl-L-Lysin-Chlormethyl Keton
Upm	Umdrehungen pro Minute
VSG	Varianten spezifisches Oberflächenglykoprotein

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung	1
1.1.	Trypanosomen als Erreger der Schlafkrankheit	1
1.2.	Klassifizierung	2
1.3.	Lebenszyklus	4
1.4.	Antigene Variation	5
1.5.	Diskontinuierliche Transkription	8
1.6.	Glykosomen	9
1.7.	Kinetoplast	10
1.8.	Transformation	11
1.9.	Struktur des Oberflächenmantels	15
1.10.	Membranverankerung durch Phosphatidylinositol	21
1.11.	Glykophosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C	24
1.12.	Problemstellung	25
2.	Materialien und Methoden	26
2.1.	Chemikalien	26
2.2.	Medien und Puffer	27
2.3.	Trypanosomen	29
2.4.	Aufbewahrung von Trypanosomen	29
2.5.	Ernten von Trypanosomen aus dem Blut infizierter Mäuse	29
2.6.	Ernten von Trypanosomen aus dem Blut infizierter Ratten	30
2.7.	(^{35}S)-Methionin Einbau	30
2.8.	(9,10-^{3}H)Myristinsäure Einbau	31

2.9. Kultivierung von Blutformzellen und Bestimmung des VSG turnover..... 31
2.10. Transformation..... 31
2.11. sVSG-Präparation..... 33
2.12. mfVSG-Präparation..... 34
2.13. Bestimmung der GPI-PLC Aktivität..... 34
2.14. Reinigung der GPI-PLC..... 35
2.14.1. Herstellen eines Detergensextraktes..... 36
2.14.2. Elektrofokusierung in einer 110 ml LKB Säule... 36
2.14.3. Affinitätschromatographie mit Affi Gel 501..... 36
2.14.4. Ionenaustauschchromatographie auf CM-Cellulose. 37
2.14.5. Reinigung der GPI-PLC auf einer Antikörper-Affinitätssäule..... 37
2.15. Rekonstitution von mfVSG und GPI-PLC in Phospholipidvesikel..... 38
2.16. Trypsinverdau der GPI-PLC..... 39
2.17. Saccharosedichtegradientenzentrifugation..... 40
2.18. Test für Antikörper gegen die GPI-PLC..... 41
2.19. Herstellen von Hybrid Zellinien..... 41
2.20. Einfrieren und Auftauen von Hybrid Zellen..... 42
2.21. Immunisierung von Mäusen und Kaninchen..... 42
2.22. Antiseren..... 43
2.23. Reinigung von IgG aus Kaninchenserum und Kopplung an CNBr-aktivierte Sepharose..... 44
2.24. Reinigung monoklonaler Antikörper aus Ascitesflüssigkeit und Kopplung an Reacti Gel..... 45
2.25. Immunpräzipitation von (^{35}S)-Methionin markiertem VSG..... 45
2.26. Jodierung und Immunpräzipitation der GPI-PLC... 46

2.27. Jodierung und Kompetitionstest der monoklonalen Antikörper..... 47
2.28. Immunfluoreszenz..... 48
2.29. Polyacrylamidgelelektrophorese und Autoradiographie..... 49
2.30. Reinigung von Phosphotidylglycerol aus Escherichia coli..... 49
2.31. Proteinbestimmung..... 50

3. Ergebnisse..... 51
3.1. Reinigung und Charakterisierung der GPI-PLC.... 51
3.1.1. Bestimmung der Aktivität der GPI-PLC..... 51
3.1.2. Teilweise Reinigung der GPI-PLC..... 54
3.1.3. Isolierung und Charakterisierung von monoklonalen anti-GPI-PLC Antikörpern..... 56
3.1.4. Reinigung der GPI-PLC mit mAT 3..... 58
3.1.5. Bestimmung des Molekulargewichts..... 59
3.1.6. Substratabhängigkeit und Substratspezifität.... 61
3.1.7. Wechselwirkung mit Lektinen..... 63
3.1.8. pH Optimum, Temperaturoptimum, Stabilität..... 63
3.1.9. Rekonstitution von mfVSG und GPI-PLC in Phospholipidvesikel..... 63
3.1.10. Präparation und Charakterisierung von polyvalenten anti-GPI-PLC Antikörpern..... 64
3.2. Lokalisation der GPI-PLC in der Zelle..... 65
3.2.1. Trypsinverdau der GPI-PLC..... 66
3.2.2. Saccharosedichtegradientenzentrifugation von Trypanosomenmembranen..... 68
3.2.3. Immunfluoreszenz..... 70

3.3. Untersuchungen zur Funktion der GPI-PLC..... 72
3.3.1. Abspaltung des Oberflächenmantels bei Zellyse.. 72
3.3.2. Abspaltung des Oberflächenmantels während der *in vitro* Kultivierung von *Trypanosoma brucei*... 73
3.3.3. Abspaltung des Oberflächenmantels während der Transformation von *Trypanosoma brucei*..... 76
3.3.4. Verschwinden der GPI-PLC während der Transformation..... 82

4. Diskussion..... 84
4.1. Eigenschaften der GPI-PLC..... 84
4.2. Lokalisation der GPI-PLC in der Zelle..... 87
4.3. Funktion der GPI-PLC..... 89

5. Zusammenfassung..... 94

6. Referenzen..... 96

1. EINLEITUNG

1.1. Trypanosomen als Erreger der Schlafkrankheit

Trypanosomen, parasitierende Protozoen, sind die Erreger mehrerer Krankheiten. Die bedeutendsten sind die Chagas Krankheit in Südamerika und die Schlafkrankheit in Afrika. Die Chagas Krankheit wird durch T. cruzi hervorgerufen, die Schlafkrankheit des Menschen beziehungsweise die Nagana Rinderseuche durch T. brucei. Die weite Verbreitung dieses Parasiten macht in großen Teilen Afrikas Viehzucht unmöglich (Abb.1).

Vor der europäischen Kolonisation Afrikas gab es nur wenige Berichte über die Schlafkrankheit. Bis Mitte des neunzehnten Jahrhunderts verhinderten die Isolation der Lebensgemeinschaften und schwierige Reisebedingungen eine Ausbreitung der Krankheit. Erst mit der Kolonisation wurde diese Isolation aufgehoben, was mehrere Epidemien zur Folge hatte. Zum Beispiel brachte 1891 eine britische Expedition die Krankheit vom heutigen Zaire nach

Abbildung 1: Verbreitung der Schlafkrankheit und der Tsetsefliege in Afrika.

Uganda, das bis zu diesem Zeitpunkt frei von Schlafkrankheit gewesen war. Sechs Jahre später waren zwei Drittel der Bevölkerung an der Krankheit gestorben. Diese und andere Epidemien erregten großes Interesse und mehrere Expeditionen wurden unternommen, um die Schlafkrankheit zu erforschen. In den Jahren 1894-1897 konnte David Bruce, ein Offizier der britischen Armee, nachweisen, daß die Nagana Rinderseuche durch Trypanosomen hervorgerufen und durch Tsetsefliegen von einem Tier auf ein anderes übertragen wird. Wenig später wurden Trypanosomen auch als der Erreger der Schlafkrankheit beim Menschen identifiziert.

Wegen ihrer ökonomischen Bedeutung und mehrerer ungewöhnlicher Eigenschaften wurden die zur Ordnung der Kinetoplastida gehörenden Trypanosomen schnell zu einem beliebten Forschungsobjekt. Zu diesen ungewöhnlichen Eigenschaften gehört erstens die antigene Variation bei afrikanischen Trypanosomen (1,2,3); zweitens die diskontinuierliche Transkription der proteincodierenden Gene, ein Phänomen, das wahrscheinlich bei allen Vertretern der Kinetoplastida auftritt (4); drittens die Glykosomen, Organelle, in denen die Glykolyse von Glukose bis 3-P-Glycerat abläuft, und die bei allen daraufhin untersuchten Vertretern der Kinetoplastida gefunden wurden (5,6,7) ; und viertens der Kinetoplast im Mitochondrion, der ein großes Netzwerk ineinanderhängender circulärer DNA-Moleküle enthält, und nach dem die Ordnung Kinetoplastida benannt wurde (8,9).

1.2. Klassifizierung

Die afrikanischen Trypanosomen sind Vertreter von drei Subgenera: Duttonella, Trypanozoon und Nannomonas, die sich anhand der Morphologie, des Wirtsspektrums und der Virulenz

unterscheiden lassen. Zusammen bilden sie die Gruppe der Salivaria (10, Abb.2). Die Arten Trypanosoma congolense und T. vivax infizieren Wild- und Haustiere und sind viel weiter verbreitet als die übrigen Arten. T. brucei ist der am besten charakterisierte Vertreter der Subgenus Trypanozoon. Drei Subspecies sind bekannt: T. brucei brucei, T. brucei rhodesiense, T. brucei gambiense. Sie unterscheiden sich morphologisch und biochemisch kaum, wohl aber in Wirtsspektrum und Virulenz. T.brucei brucei wird in menschlichem Blut durch "high density lipoprotein" lysiert (11), ist also nicht humanpathogen, T. brucei rhodesiense und T.brucei gambiense sind die Erreger der Schlafkrankheit im Menschen.

Die bisher genannten Arten werden alle durch die Tsetsefliege Glossina übertragen und durchlaufen im Insekt mehrere Entwicklungsstadien. T. evansi infiziert vor allem Pferde und Kamele und wird durch andere Vertreter der Diptera rein mechanisch übertragen, im Invertebratenwirt finden sich keine unterschiedlichen Entwicklungsstadien. T.equiperdum wird bei der Kopulation zwischen Pferden übertragen, ein Vektor ist nicht vorhanden, die Verbreitung daher nicht auf Afrika beschränkt.

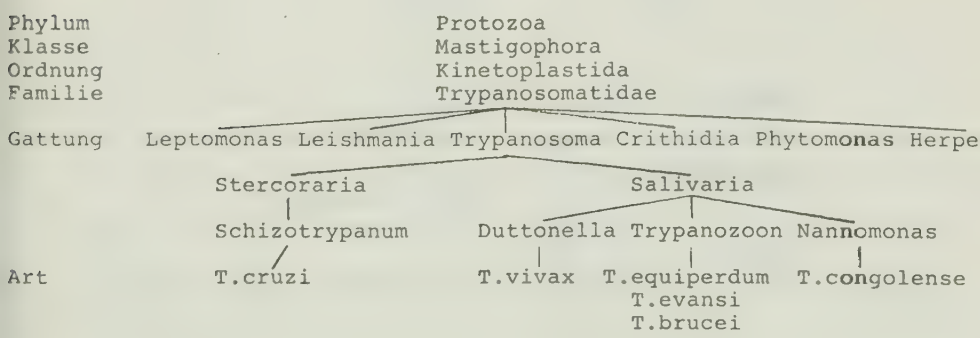


Abbildung 2: Klassifizierung einiger Trypanosomen

1.3 Lebenszyklus

Wie bereits erwähnt wird T.brucei durch verschiedene Tsetsefliegenarten der Gattung Glossina von befallenen auf nicht befallene Tiere übertragen. Infiziert sich eine Tsetsefliege beim Saugen des Blutes eines befallenen Tieres, entwickeln sich in ihrem Verdauungstrakt schnell sogenannte procyclische Trypanosomen (12,13), deren Plasmamembran nicht wie die der Blutform im Wirbeltier von einem Oberflächenmantel bedeckt ist (14) (Abb.3). Der Oberflächenmantel der Blutform besteht aus einem einzigen, für jeden individuellen Trypanosomenklon charakteristischen Glykoprotein (VSG = Variant Surface Glycoprotein)(15,16). Procyclische Zellen, die sich durch Zweiteilung vermehren, sind nicht infektiös für den Vertebratenwirt (17,18) und haben einen stark veränderten Metabolismus. Nach ungefähr drei Wochen wandern die Parasiten vom Darm zur Speicheldrüse, wo sie zu metacyclischen Trypanosomen differenzieren. Diese Form ist morphologisch ähnlich der Blutform, ihre Oberfläche ist vollständig mit VSG

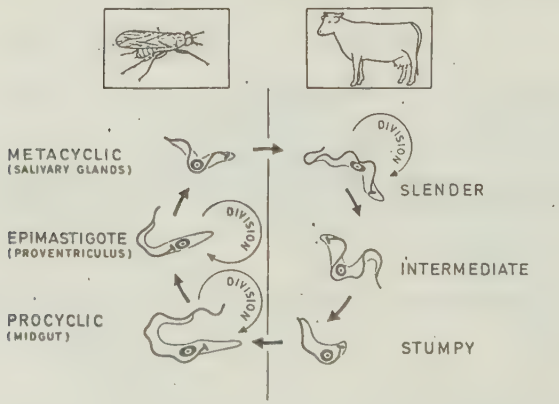


Abbildung 3: Lebenszyklus von Trypanosoma brucei brucei

bedeckt (19,20), und sie ist infektiös für den Vertebratenwirt. Bei der nächsten Mahlzeit der Fliege gelangen ungefähr 10^4 Trypanosomen in das Blut des Säugetiers. Hier entstehen aus den metacyclischen Trypanosomen lange schlanke Parasiten, die wiederum ihren Metabolismus verändern (12). Die lange schlanke Blutform differenziert sich im Blut zur kurzen "stumpy" Blutform (13,21). "Stumpy" Trypanosomen teilen sich nicht mehr (13) und es wird angenommen, daß der Parasit in diesem Entwicklungsstadium an das Leben im Insekt präadaptiert ist (17). Bei der nächsten Mahlzeit der Tsetsefliege gelangen die Trypanosomen wieder in den Verdauungstrakt des Insekts und differenzieren zu procyclischen Zellen (22), der Entwicklungszyklus ist geschlossen.

1.4. Antigene Variation

Während einer Trypanosomeninfektion bildet der Vertebratenwirt Antikörper gegen das in der Population vorherrschende Oberflächenantigen. Durch die Immunantwort des Wirtes wird der größte Teil der Trypanosomenpopulation abgetötet. Einige Parasiten haben aber bereits begonnen ein neues, andersartiges VSG zu synthetisieren und entkommen so der Immunantwort des Wirtes. Der Wechsel des Oberflächenantigens beruht auf der sequentiellen Expression verschiedener Gene und wird als antigene Variation bezeichnet. Nach 7 - 10 Tagen kommt es zu einem neuen Anstieg der Parasitämie, wobei durch erneute Immunantwort des Wirtes auch diese Population zum größten Teil abgetötet wird. Das Resultat ist eine oscillierende Parasitämie, wobei alle 7 - 10 Tage serologisch verschiedene Parasiten erscheinen. Eine solche Infektion kann sich über Monate hinziehen. In afrikanischen Wildtieren, die an T. brucei adaptiert sind, bleibt die Trypanosomenzelldichte niedrig

und die chronische Infektion kann sogar überwunden werden. Bei importierten Rindern oder beim Menschen endet eine unbehandelte Infektion meist mit dem Tod.

Der Wechsel des Oberflächenantigens bei Trypanosomen basiert auf der sequentiellen Expression verschiedener VSG-Gene (1,2,3). Durch diesen Wechsel ist es dem Parasiten möglich der Immunantwort des Wirtes zu entkommen. Das einzige an der Oberfläche des Parasiten exponierte Antigen, das VSG, ist sehr immunogen, und das Abtöten des Parasiten wird durch Antikörper bewirkt. Der Wechsel des Antigens erfolgt auch in Tieren, deren Immunsystem zerstört wurde oder in in vitro Kulturen, die Antikörper sind also nicht die Auslöser der antigenen Variation (23). Jedes einzelne VSG wird von einem Gen codiert, die Anzahl der VSG-Gene liegt zwischen 100 und 1000 (24,25).

Man kann vier Mechanismen unterscheiden, wie VSG-Gene aktiviert werden. Die Expression eines VSG-Gens ist in den meisten Fällen mit der Verdoppelung einer sogenannten Grundkopie und der Transposition dieser neuen Kopie in eine Expressionsstelle am Telomer eines Chromosoms gekoppelt. Dabei kann die Grundkopie im

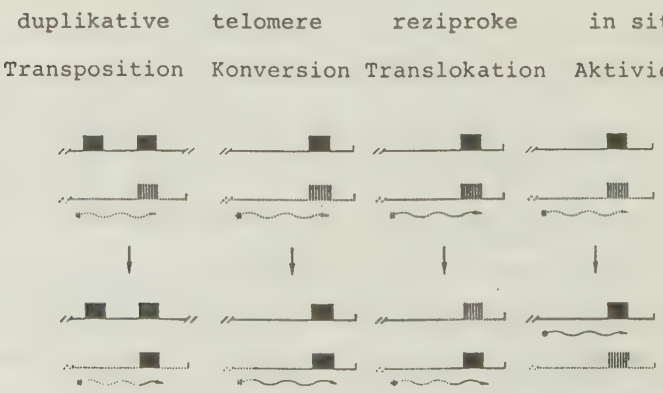


Abbildung 4: Aktivierung von VSG-Genen (aus (4)).
(Erläuterungen siehe im Text)

Inneren eines Chromosoms (26-32) oder an einem Telomer lokalisiert sein (30,33-43). Die duplikative Transposition erfolgt wahrscheinlich durch Genkonversion (44,45, Abb.4: duplikative Transposition und telomere Konversion). Es gibt aber auch VSG-Gene, für deren Expression eine Verdoppelung des Genes keine Voraussetzung ist. Dabei kommt es entweder zu einem reziproken Crossover von Telomeren, wobei ein inaktives telomeres VSG-Gen und ein aktives telomeres VSG-Gen ihre Position tauschen (46, Abb.4: reziproke Translokation) oder ein zuvor inaktives telomeres VSG-Gen wird ohne erkennbares DNA Rearragement aktiviert (Abb.4: in situ Aktivierung).

Während einer chronischen Infektion werden die verschiedenen VSGs in einer weitgehend zufälligen Reihenfolge exprimiert (47-51,25). Es gibt mehrere Faktoren, die die Reihenfolge der VSG-Genexpression beeinflussen. VSG-Gene, die bevorzugt zu einem frühen Zeitpunkt der Infektion exprimiert werden, liegen immer an einem Telomer (28,30,31,35,42,47-52). Einige dieser Gene sind in inaktiven Expressionsstellen lokalisiert, die wieder aktiviert werden können, andere werden durch Genkonversion in eine aktive Expressionsstelle transponiert. Gene, die während einer Infektion spät exprimiert werden, können in einer späteren Infektion zu preferentiell früh exprimierten Genen werden, wenn sie an ein solchermaßen früh aktiviertes Telomer transponiert werden. Das heißt, weniger die Qualität des Gens, als vielmehr die Qualität des Telomers ist ausschlaggebend für den Zeitpunkt der Expression des Gens, das an diesem Telomer lokalisiert ist (28,37,52). Ein weiterer Faktor, der die Reihenfolge der exprimierten VSGs beeinflussen könnte, ergibt sich aus unterschiedlichen Wachstumsraten in Abhängigkeit vom exprimierten VSG (53,54). Varianten, die schneller wachsen als andere, sollten früher während der

Infektion erscheinen.

Beim Wechsel des Oberflächenmantels haben Trypanosomen zwei verschiedene VSGs an ihrer Oberfläche (55). Die Bildung eines funktionellen Oberflächenmantels, der den Zutritt lytischer Serumkomponenten zur Plasmamembran verhindern soll, erfordert aber eine dichte Packung, der den Oberflächenmantel bildenden, Moleküle. Bestimmte Kombinationen von VSG Molekülen könnten daher zu einem schlechten, "undichten" Oberflächenmantel führen, der Parasit würde bei einem solchen Wechsel des VSG nicht überleben. Daher könnte auch auf diese Art und Weise die Reihenfolge der Expression verschiedener VSGs beeinflusst werden.

1.5 Diskontinuierliche Transkription

Eine Analyse der Transkriptionsprodukte von VSG-Genen ergab, daß alle VSG mRNAs am 5´-Ende die gleiche, 35 Nukleotide lange Sequenz tragen. Auch die meisten, vielleicht alle, anderen mRNAs in Trypanosomen und anderen Flagellaten der Ordnung Kinetoplastida besitzen diese Sequenz am 5´-Ende (56-59). Alle bisherigen Versuchsergebnisse sprechen dafür, daß in diesen Organismen bei der Synthese von mRNAs RNA-Segmente, die von zwei unterschiedlichen Transkriptionseinheiten abstammen, verbunden werden, die Transkription erfolgt also diskontinuierlich (4).

Das, die 35 Nukleotid Sequenz codierende sogenannte "mini exon", gibt es ungefähr 200-mal pro Zellkern (60,61). Es liegt in einem 1.35 kb langen DNA-Segment (61,62), das mehrfach wiederholt hintereinander vorliegt. Das "mini exon" wird in eine 140 Nukleotide lange RNA (medRNA = mini exon derived RNA) transkribiert, die die 35 Nuleotide Sequenz an ihrem 5´Ende trägt (63-67).

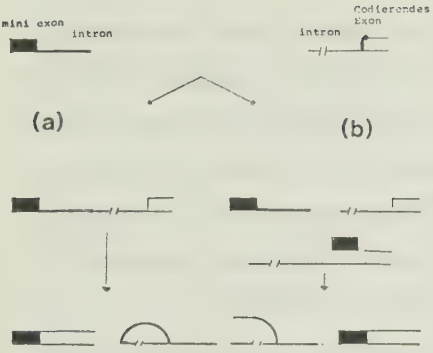


Abbildung 5: Transspleissen von medRNA und dem Transkript des Protein codierenden Gens. Die medRNA und das Transkript des Protein codierenden Gens werden nicht miteinander verbunden. Daher entsteht beim Spleissen ein verzweigtes DNA Molekül (b). Bei konventionellem Spleissen würde ein DNA Molekül in der Form eines Lassos entstehen (a).

Anschließend werden "mini exon" und das Transkript des proteincodierenden Gens durch Transspleissen miteinander verbunden. Die medRNA und das Transskript des proteincodierenden Gens werden also vor dem Spleissen nicht miteinander verbunden. Als Nebenprodukt des Spleissens entsteht aus den abgeschnittenen Introns ein DNA Molekül in der Form eines Y (68,69)(Abb. 5b). Beim konventionellen Spleissen hätte man ein DNA Molekül in der Form eines Lassos erwartet (Abb.5a).

1.6. Glykosomen

Der Glukoseabbau in T. brucei unterscheidet sich von dem anderer Eukaryonten in mehrfacher Hinsicht (70). In Blutformzellen wird Glukose durch Glykolyse in zwei Moleküle Pyruvat umgewandelt. Da Trypanosomen keine Laktatdehydrogenase besitzen, können die während der Glykolyse freigesetzten Reduktionsäquivalente nicht durch Reduktion von Pyruvat regeneriert werden. Pyruvat wird ins Medium ausgeschieden, die Reduktionsäquivalente werden durch eine mitochondriale Glycerin-3-P-oxidase reoxidiert (71) (Abb.6). Diese Glycerin-3-P-oxidase kann durch Salicylhydroxamsäure inhibiert werden (72,73). Eine solche Inhibierung

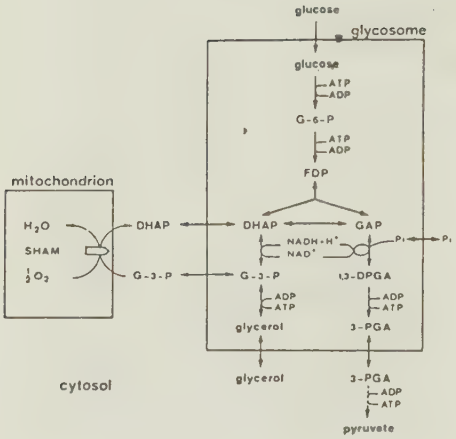


Abbildung 6: Kompartimentierung der Glykolyse bei T. brucei.

der Atmung tötet die Blutformzellen von T. brucei allerdings nicht ab, da der Organismus auch unter anaeroben Bedingungen überleben kann, wobei Glukose zu gleichen Mengen Pyruvat und Glycerin abgebaut wird. Dabei wird aus Glycerin-3-P und ADP durch die Glycerinkinase ATP und Glycerin gebildet (74). Diese Reaktion ist nur deshalb möglich, weil in Trypanosomen die glykolytischen Enzyme in speziellen Membranvesikeln, den Glykosomen, lokalisiert sind und daher Glycerin-3-P und ADP in diesen Vesikeln in hoher Konzentration vorliegen (5,6,74,75). In anderen Eukaryonten und Prokaryonten befinden sich die glykolytischen Enzyme bekanntlich im Cytosol, die Glykosomen gibt es nur bei den Vertretern der Trypanosomatidae.

1.7. Kinetoplast

Die Vertreter der Kinetoplastidae enthalten ein einzelnes großes Mitochondrium, das ein Netzwerk ineinanderhängender circulärer DNA-Moleküle enthält und als Kinetoplast bezeichnet wird. Die Kinetoplasten DNA (kDNA) besteht aus 50-100 "Maxicircles" (20-40kb) und tausenden "Minicircles" (1-2.5kb). Alle Maxicircles eines Organismus haben die gleiche Sequenz. Sie

codieren, wie die mitochondriale DNA anderer Eukaryontenzellen, für ribosomale- und transfer-RNAs, bestimmte Untereinheiten der Cytochromoxidase und der mitochondrialen ATPase, sowie andere Proteine (75-80). Die einzelnen Minicircles unterscheiden sich in ihrer Sequenz, sie sind sehr instabil, und ihre Sequenz verändert sich ständig (81-84). Sie werden wahrscheinlich nicht transkriebiert, ihre Funktion ist unklar (75,77,85). Mutanten ohne kDNA können zwar im Vertebratenwirt wachsen, nicht aber als procyclische Form im Insekt, da Maxicirclesequenzen für Proteine codieren, die für den Aufbau einer funktionellen Atmungskette, wie sie in procyclischen vorkommt, notwendig sind (82,86). Mutanten, die zwar Maxicircles, aber keine Minicircles haben, wurden bisher noch nicht beobachtet. Daher ist unklar, ob die Minicircles vielleicht in einem anderen Abschnitt des Lebenszyklus des Parasiten eine essentielle Rolle spielen.

1.8. Transformation

Der einzige Entwicklungsschritt im Lebenszyklus von T. brucei, der relativ leicht in vitro durchgeführt werden kann, ist die Transformation der Blutformen zu procyclischen Zellen (14,87-97). Procyclische Zellen aus in vitro Kulturen entwickeln sich zu infektiösen metacyclischen Formen, wenn sie von einer Tsetsefliege aufgenommen werden (98,99). Die Transformation von procyclischen zu metacyclischen Zellen erfordert die Inkubation von etablierten procyclischen Zellen mit Explantaten der Speicheldrüse von Tsetsefliegen (90).

Während der Transformation der Blutform zu procyclischen Trypanosomen lassen sich morphologische und biochemische Veränderungen beobachten. Die VSG Synthese in den bemantelten

Blutformzellen wird reprimiert, und der Oberflächenmantel wird abgespalten (14,92,95). In der Blutform ist das Mitochodrion inaktiv und hat keine Cristae, Krebs-Zyklus-Enzyme und Cytochrome fehlen. In der "stumpy" Form wurden mehrere mitochondriale Funktionen nachgewiesen, der Krebs-Zyklus kann aber nicht ablaufen (100,101). Während der Transformation zu procyclischen Zellen vergrößern sich die Mitochondrien, es entstehen viele Cristae, die Zellen entwickeln ein Cyanid- sensitives Elektronentransportsystem (17,70,93,98,103-106). Etablierte procyclische Zellen oxidieren Glukose hauptsächlich zu CO_2 (103), Prolin wird zu Glutamat, Alanin, CO_2 und anderen Produkten verstoffwechselt. Die Veränderungen des Metabolismus spiegeln die unterschiedliche Energieversorgung von Blutform und procyclischen Zellen wider. Im Blut des Säugetiers ist Glukose die Hauptenergiequelle, im Verdauungstrakt des Insekts Aminosäuren und Peptide.

Lange Zeit war es schwierig den Transformationsprozess zu untersuchen, da nur ein Teil einer Blutformpopulation zu procyclischen Zellen differenzierte. Wie bereits erwähnt ist die "stumpy" Form auf das Leben im Insekt präadaptiert, es gibt aber auch Hinweise, daß intermediäre Formen *in vitro* transformieren können (92). Deshalb war der Verlauf der Transformation einer Blutformpopulation von der Anzahl der "stumpy" und intermediären Formen abhängig. Die Suche nach Faktoren, die die Transformation von Blutform zu procyclischen Zellen auslösen können, ergab, daß eine synchrone Transformation *in vitro* zwei Signale erfordert: ein Absenken der Temperatur von 37°C auf 27°C und die Zugabe von Citrat und cis-Aconitat zum Kulturmedium (94-97). Das Absenken der Temperatur könnte auch *in vivo* ein Auslöser für die Transformation sein. Unklar ist allerdings ob es *in vivo* auch ein Äquivalent für die Krebs-Zyklus-Intermediate gibt. Der Effekt von

Citrat und cis-Aconitat auf monomorphe Blutform Zellen wurde kürzlich im Detail untersucht (107). Im Gegensatz zu einem pleomorphen Trypanosomenstamm differenzieren die Blutformen eines monomorphen Stammen nicht zur kurzen "stumpy" From. Inkubiert man monomorphe Blutformen in der Gegenwart von cis-Aconitat/Citrat (CCA) bei 27°C, differenzieren sie wie die Zellen eines pleomorphen Stammes zu procyclischen Zellen (Abb.7). Gibt man den Zellen nur eines der zwei Signale, die erforderlich sind, um diese Differenzierung auszulösen, reagieren sie auf zwei verschiedene Arten. Inkubiert man Blutformzellen in der Gegenwart von CCA bei 37°C, transformieren die meisten unvollständig und sterben nach 2-3 Tagen ab. Ein kleiner Teil der Population adaptiert sich jedoch an die neuen Kulturbedingungen und kann als Blutform kutiviert werden. CCA-adaptierte Zellen unterscheiden sich in ihrem Wachstum und Stoffwechsel nicht von nicht CCA-adaptierten Zellen und transformieren beim Absenken der Temperatur auf 27°C normal. Bei einer unvollständigen Transformation werden zwar die VSG Synthese reprimiert, der Oberflächenmantel

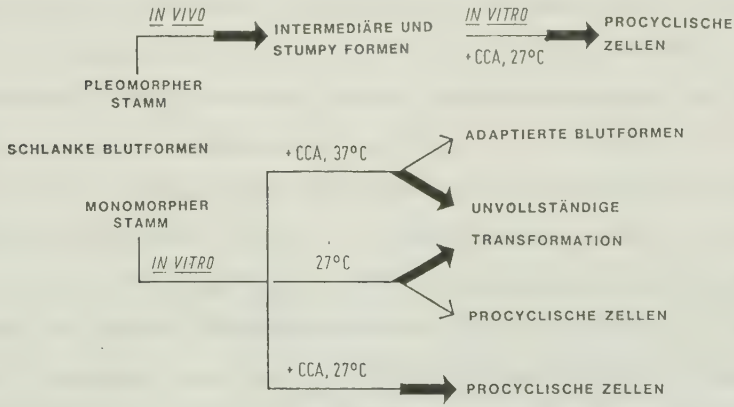


Abbildung 7: Schematische Zusammenfassung

abgespalten und mitochondriale Enzyme induziert (Aconitase, Succinat und Prolin- oxidase), aber die Zellen sind nicht in der Lage sich zu teilen und sterben deshalb ab. Etablierte procyclische Zellen wurden aber bereits bei 37°C kultiviert (108). Auch bei einem Absenken der Temperatur auf 27°C ohne Zugabe von CCA sterben die meisten Zellen nach 2-3 Tagen ab. Einerseits können sie unter diesen Bedingungen nicht transformieren, auf der anderen Seite sind sie aber auch nicht in der Lage sich zu teilen. Ein kleiner Teil der Population jedoch transformiert und führt zu einer etablierten Kultur procyclischer Zellen.

Diese Versuchsergebnisse lassen sich so erklären, daß die intrazelluläre Konzentration der Krebs-Zyklus-Intermediate bestimmt, ob die Zellen zu procyclischen Zellen transformieren oder als Blutform weiterwachsen. Solange die Blutformzellen bei 37°C ihren Energiebedarf fast ausschließlich durch Glykolyse decken ist die Konzentration der Krebs-Zyklus-Intermediate niedrig. Wird die Konzentration der Intermediate aber durch die Zugabe von CCA künstlich erhöht, wird die Synthese charakteristischer Enzyme wie der Prolinoxidase induziert, und die Zellen transformieren zumindest unvollständig. Daher ist auch bei 27°C in einem Glukose-reichen Medium die Zugabe von CCA notwendig, damit ein Großteil der Population transformiert. Da die auf das Leben im Insekt vorbereitete "stumpy" Form bereits Prolinoxidase enthält, könnte in diesen Zellen, nachdem sie in den Fliegendarm gelangt sind, durch den Abbau von Prolin die intrazelluläre Konzentration von Krebs-Zyklus-Intermediaten ansteigen, was wiederum mitochondriale Enzyme aktivieren und/oder deren Synthese induzieren könnte. Tatsächlich sind 27.5% der Prolinabbauprodukte in procyclischen Zellen Carbonsäuren, wahrscheinlich Krebs-Zyklus-Intermediate (109, 110). Es bleibt unklar, ob die Blut-

formen nach Aufnahme in den Fliegendarm einem den Krebs-Zyklus-Intermediaten entsprechendem Signal ausgesetzt sind. Da bereits wenige Trypanosomen, die nach einer Blutmahlzeit in der Fliege transformieren, zu einer Infektion im Verdauungstrakt führen können, erscheint es durchaus möglich, daß es in vivo keinen spezifischen, die Transfromation induzierenden Faktor gibt.

1.9. Struktur des Oberflächenmantels

Eine der offensichtlichsten morphologischen Veränderungen während der Transformation ist der Abwurf des Oberflächenmantels (92-93,95,111). Der Oberflächenmantel der Blutform besteht aus ungefähr 10^7 VSG-Molekülen pro Zelle, die die Plasmamembran als monomolekulare, 12-15 nm dicke Schicht bedecken und sie gegen lytische Faktoren im Serum schützen. Die VSG Moleküle sind die einzige antigene Struktur, die im Blut an der Oberfläche des Parasiten exponiert ist. Wird der Oberflächenmantel durch Proteolyse (112) oder in Kultur (17) entfernt, werden allen Trypanosomem gemeinsame antigene Determinanten exponiert (18), unter anderem auch solche, die den alternativen Weg der Komplementationskaskade aktivieren; der Parasit wird dann durch Nicht-Immunserum lysiert (113,114).

Drei Eigenschaften des VSG haben seine Charakterisierung sehr erleichtert. Erstens wird es in großen Mengen synthetisiert (7-10% des Zellproteins), zweitens wird bei Zellaufbruch das membrangebundene VSG (membrane form VSG = mfVSG) schnell in einer wasserlöslichen Form (soluble VSG = sVSG) abgegeben, eine Eigenschaft, die allen Trypanosomen der Salivaria, die daraufhin untersucht wurden, gemeinsam ist; und drittens läßt es sich leicht reinigen. So isolierte VSGs bestehen aus einer einzigen

Polypeptidkette (MW: 50000-60000), unterscheiden sich in ihrem isoelektrischen Punkt, Aminosäuregehalt und Sequenz, im Kohlenhydratgehalt (7-17% w/w) und in der Zusammensetzung und Position der Kohlenhydratseitenketten (15,115-119). Abbildung 8 zeigt schematisch den Aufbau eines VSG Moleküls. Ein solches Molekül besteht aus ungefähr 500 Aminosäuren, wobei nur innerhalb der 100 C-terminalen Aminosäuren Homologien zwischen verschiedenen VSGs auftreten. Begrenzter Trypsinverdau spaltet das Molekül in die N-terminale hypervariable Region(~ 2/3 des Moleküls) und die mehr konservierte C-terminale Region (~ 1/3 des Moleküls) (112,116). Die C-terminale Aminosäure ist ein Aspartat, Serin oder, in einem Fall, ein Asparagin (115,116). An der α-Carboxylgruppe der C-terminalen Aminosäure ist über ein Ethanolamin eine Kohlenhydratkette (CHO) gebunden, die im VSG der Variante MiTat 1.4 aus 4 Galaktose- und 2 Mannose-Resten aufgebaut ist und außerdem Phosphat

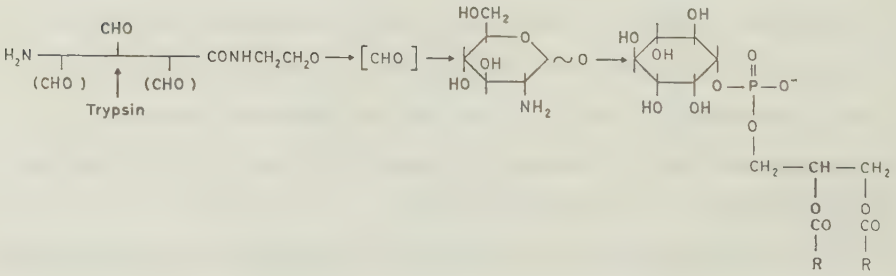


Abbildung 8: Schematischer Aufbau eines mfVSG-Moleküls.
Alle VSGs bestehen aus ungefähr 500 Aminosäuren. Trypsin spaltet das Molekül in zwei Domänen, die hypervariable N-terminale Domäne, und die homologe C-terminale Domäne. Das membrangebundene VSG ist durch ein über Ethanolamin an die -Carboxylgruppe der C-terminalen Aminosäure gebundenes Glykolipid in der Membran verankert. Die Fettsäure im VSG von T. brucei ist Myristinsäure. Neben den Kohlenhydratresten in diesem Glykolipid enthält das VSG auch ein oder mehrere N-glykosidisch gebundene Kohlenhydratseitenketten.

enthält. Über nicht acetyliertes Glukosamin ist das Oligosaccharid mit Phosphatidylinositol verknüpft (120-122,123). Die Fettsäure im VSG von T.brucei ist Myristinsäure (124). Innerhalb dieser Struktur gibt es eine antigene Determinante, die fast allen VSGs gemeinsam ist und deshalb auch kreuzreagierende Determinante (cross reacting determinant = CRD) genannt wird (115). Diese CRD ist im mfVSG nicht zugänglich (125). Die anderen Kohlenhydratseitenketten im VSG sind N-glykosidisch an Asparagin gebunden. Alle VSGs enthalten wenigstens eine solche Kohlenhydratseitenkette. Das heterogene Verhalten einiger VSGs während der Polyacrylamidelektrophorese in der Gegenwart von SDS läßt sich auf die Heterogenität ihrer internen Kohlenhydratseitenketten zurückführen (126). Im Gegensatz zur Synthese der CRD ist die Synthese der N-glykosidisch gebundenen Kohlenhydratseitenketten Tunicamycin sensitiv. Tunicamycin ist ein Strukturanaloges von UDP-N-Acetylglukosamin und inhibiert die Übertragung von N-Acetylglukosamin-1-phosphat auf Dolicholphosphat. Die Synthese dieser an Lipid gebundenen Oligosaccharide und die anschließende Übertragung auf das Protein scheint in allen Eukaryonten gleich abzulaufen (127) und wurde auch in T. brucei verwandten Organismen, nämlich Crithidia fasciculata (128) und T. cruzi (129) nachgewiesen.

Über die Biosynthese des C-terminalen Glykolipids ist nur bekannt, daß es bereits eine Minute nach Fertigstellung der Polypeptidkette am C-Terminus des Proteins nachgewiesen werden kann (130). Ein Vergleich der Aminosäuresequenz des Proteins mit der cDNA zeigte, daß das VSG als Vorläufer mit Verlängerungen an beiden Enden synthetisiert wird (131,132). Die mRNA codiert für eine Sequenz von 17-22 hydrophoben Aminosäuren am C-Terminus des Proteins. Vorläufer, die diese Sequenz enthalten, konnten bislang

nicht nachgewiesen werden, wahrscheinlich deshalb, weil diese Sequenz sehr schnell durch das die CRD enthaltende Glykolipid ersetzt wird (130). Vermutlich ist das VSG bis zu diesem Zeitpunkt durch die 17-22 Aminosäuren lange Sequenz in der Membran des endoplasmatischen Reticulums verankert. Am N-Terminus findet man wie bei fast allen Glykoproteinen, die an die Zelloberfläche transportiert werden, eine sogenannte Signalsequenz, die co-translational in vivo und in vitro abgespalten wird (133-137). Insgesamt beinhaltet die Biosynthese des VSG also vier co- beziehungsweise posttransalationale Modifikationen: Abspalten des N-terminalen Signalpeptids, Anknüpfen der N-glykosidisch gebundenen Oligosaccharide, Prozessieren der C-terminalen hydrophoben Sequenz, und Anknüpfen des die CRD enthaltenden Glykolipids.

Die Bildung eines funktionellen Oberflächenmantels, der als Permeabilitätsbarriere dienen soll, um darunter liegende Strukturen abzudecken, erfordert neben der Verankerung des Oberflächenmantels in der Membran auch Wechselwirkungen, die die den Oberflächenmantel bildenden Moleküle zusammenhalten. Das VSG ist wahrscheinlich mit dem C-terminal gebundenen Glykolipid in der Membran verankert. Wechselwirkungen zwischen den einzelnen VSG Molekülen konnten ebenfalls nachgewiesen werden, denn sowohl sVSG wie auch mfVSG bilden nicht kovalent gebundene Dimere und höhere Oligomere (138,139).

Inwieweit sich verschiedene VSGs in der dreidimensionalen Stuktur der N-terminalen Domäne ähneln, ist noch unklar. Auf der einen Seite müssen alle VSG-Moleküle in der Lage sein, einen kompakten, für lytische Serumfaktoren impermeablen, Oberflächenmantel aufzubauen und zwar auch dann, wenn gleichzeitig zwei verschiedene VSGs exprimiert werden, wie es beim Wechsel des

Oberflächenmantels der Fall ist (55). Auf der anderen Seite dürfen die an der Oberfläche exponierten Epitope der VSGs keine gemeinsamen antigenen Determinanten aufweisen. Tatsächlich reagieren die meisten monoklonalen Antikörper, die mit löslichem VSG reagieren nicht mit lebendigen Trypanosomen. Dies zeigt, daß am lebenden Trypanosom viele Epitope des VSG für Antikörper nicht zugänglich sind (140,141) und die Aminosäuresequenzen verschiedener VSGs weisen innerhalb dieser Region keine Homologien auf (116).

Die Auswertung von Circular Dichroismus Spektren ergab, daß der α-Helix Gehalt der meisten untersuchten VSGs niedrig ist (28-38%); nur bei einem VSG wurde ein α-Helix Gehalt von 49% gemessen (142). Im Gegensatz dazu deuten Strukturvorhersagen, die anhand von Sequenzanalysen verschiedener VSGs gemacht wurden, darauf hin, daß alle VSGs einen hohen α-Helix Gehalt haben (143). Allerdings befinden sich die Bereiche mit hohem α-Helix Potential in verschiedenen Molekülen an unterschiedlichen Positionen im Molekül.

Elektronenmikroskopische (144), hydrodynamische (139) und Röntgenstrukturanalysen (145) ergaben, daß die untersuchten VSGs einen ähnlichen, stabförmigen Aufbau haben. Die Röntgenstrukturanalyse der aminoterminalen Domäne eines löslichen VSG Dimers zeigt ein 9 nm langes stabförmiges Molekül, das aus je zwei 8 nm langen α-Helices pro Monomer aufgebaut ist (145).

Die Ergebnisse Ramanspektroskopischen Untersuchungen deuten ebenfalls darauf hin, daß verschiedene VSG-Moleküle eine ähnliche Sekundärstruktur haben, obwohl die Aminosäuresequenz innerhalb der N-terminalen Region dieser Moleküle keine Homologien aufweist. Abbildung 9 zeigt ein schematisches Modell eines VSG Moleküls. Es basiert auf den Ergebnissen von Ramanspektroskopiemessungen

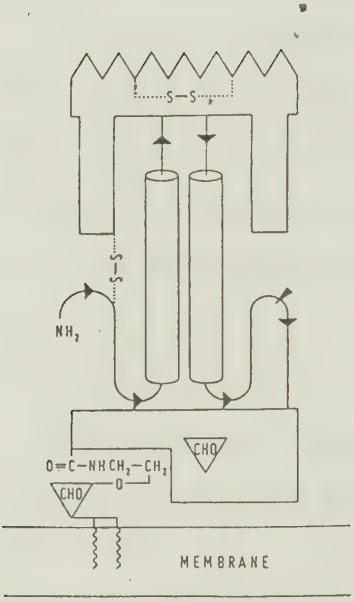


Abbildung 9: Schematisches Modell für den Aufbau des MiTat 1.4 VSG.
Die zwei Zylinder repräsentieren zwei lange α-Helices, die Zickzacklinie zeigt die Region mit Abschnitten hohen ß-turn Potentials, in der die immunologischen Epitope lokalisiert sein könnten. Der lange Pfeil (▼) zeigt die Trypsinspaltstelle zwischen der N- und C-terminalen Region des Moleküls. CHO entspricht Kohlenhydratresten, die innerhalb des Moleküls N-glykosidisch gebunden sind oder Teil des C-terminalen Glycolipids, das das Molekül in der Plasmamembran verankert, bilden.

und Strukturvorhersagen 7 verschiedener VSGs (146) und der Röntgenstrukturanalyse des MiTat 1.2 VSGs (145). Die N-terminale Region eines VSG-Moleküls soll nach diesem Modell ein Bündel von zwei langen α-Helices bilden. Eine solch Anordnung von α-Helices im VSG-Molekül könnte allen VSG-Molekülen gemeinsam sein auch wenn die die α-Helix bildenden Abschnitte sich in ihrer Sequenz und in ihrer Lokalisation innerhalb des Moleküls unterscheiden. Die α-Helices wären ein konserviertes Strukturelement des Moleküls, um das der Rest der Polypeptidkette und die Kohlenhydratseitenketten angeordnet sind. Das Segment zwischen den beiden Helices besitzt viele Abschnitte mit hohem "ß-turn" Potential und enthält vielleicht die immunologischen Epitope. Der resultierende stabförmige Aufbau des VSG-Moleküls würde den Aufbeu eines dichten Oberflächenmantels erleichtern.

1.10. Membranverankerung durch Phosphatidylinositol

Neben VSG sind auch gp 63 in Leishmanien (147), das Oberflächenantigen von Paramecium (148), alkalische Phosphatase (149), 5´- Nukleotidase (150), Thy 1 (151,152), "neural Cell Adhesion Molecule 120" (nCAM 120) (153), "Decay Accelarating Factor" (DAF) (154), Acetylcholinesterase (155,156), und die durch Insulinbehandlung ausgelösten Modulatoren der Phosphodiesterase (PDE)(157,158) in Säugetierzellen durch einen Phosphatidylinositol-Rest in der Plasmamembran verankert (Tabelle 1). gp 63 ist ein Oberflächenglykoprotein in Leishmanien, das am Eindringen des Parasiten in den Makrophagen beteiligt ist (160). Die Funktion von Thy 1 ist unbekannt, aber man nimmt an, daß es ein Immunoglobulin-ähnliches Molekül ist, das an Erkennungsprozessen beteiligt ist (161,162). nCAM 120 ist ebenfalls ein Membranprotein, das bei Erkennungs- und Adhesionsprozessen eine Rolle spielt (163,164). Die Funktion der alkalischen Phospatase, der Acetylcholinesterase, der 5´- Nukleotidase, und des Oberflächenantigens von Paramecium sind unbekannt. DAF ist ein Membranprotein, das die Auslösung der Komplementkaskade inhibiert und so körpereigene Zellen vor der Lyse durch Komplement schützt (165-167). Die Modulatoren der cAMP Phosphodiesterase sind zwei Moleküle geringen Molekulargewichts (1000-2000), die die Aktivität der Phosphodiesterase in Fettzellen beeinflussen können, wenn sie durch eine endogene Phospatidylinositol-spezifische Phospholipase C von dem Glykolipid, mit dem sie in der Membran von Leberzellen verankert sind, abgespalten werden (157,158).

Die Zahl der Beispiele für über Phosphytidylinositol in der Membran verankerte Proteine wächst also rasch. Auf diese Weise verankerte Proteine können nicht mit dem Cytoskelett wechsel-

Tabelle 1: Eigenschaften der Proteine, die mit Phosphatidylinositol in der Membran verankert sind

	VSG	gp63	SAg Paramecium	Alk.Phos-phatase	5'-Nukleo-tidase	Thy 1	DAF	nCam	AChE	PDE-Modulatoren
Molekular gewicht x 10^{-3}	57	63	300	70	70	18	70	120	65	1-2
Abspaltung von Membranen durch S.aureus Phospholipase C.	-	+	-	+	+	+	(+)	+	(+)	+
Abspaltung von Membranen durch endogene Phospholipase C.	+	-	+	+	?	?	?	?	?	?
Aufbau der C-terminalen Domäne:										
Ethanolamine	+	?	?	?	?	+	?	?	+	?
Glukosamin	+	?	?	?	?	+	?	?	+	+
andere Zucker	+	?	?	?	?	+	?	?	+	?
Phosphatidylinositol/Fettsäuren	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
kreuzreagierende Determinante	+	+	+	?	?	+	?	?	+	?

wirken, von dort daher auch nicht in ihrer lateralen Beweglichkeit in der Membran eingeschränkt werden. Thy 1 und VSG werden als Vorläufer synthetisiert, die durch eine Sequenz hydrophober Aminosäuren in der Membran verankert sind. Diese Sequenz wird aber sehr schnell durch das Glykolipid ersetzt wird (168,130). nCAM 120 unterscheidet sich von nCAM 140 und nCAM 180 nur durch das Fehlen einer C-terminalen Verlängerung, mit dem nCAM 140 und nCAM 180 in der Membran verankert sind (169). Die laterale Diffusion von Thy 1 in der Plasmamembran von Lymphocyten wurde von Dragsten et al., (170), die von mfVSG in der Plasmamembran von T.brucei von Bülow et al., (171), untersucht. Der Diffusionskoeffizient ergab sich zu 2-3 x 10^{-10} cm²/sec, unterscheidet sich also nicht wesentlich von der lateralen Diffusionsgeschwindigkeit anderer Membranproteine, wie zum Beispiel der des Fc-Rezeptors auf Mastzellen (172), der des Insulin- und "epidermal growth factor" - Rezeptors auf Fibroblasten (173), oder der der "wheat germ agglutinin" Bindungsstelle (174) und unselektiv markierter Proteine (175-177). Auch die mit Phosphatidylinositol verankerten Proteine diffundieren in der Plasmamembran also langsamer, als es Messungen an integralen Membranproteinen in Lipiddoppelschichten erwarten lassen ($D \approx 10^{-9}$ cm²/sec)(178). Da eine Wechselwirkung dieser Proteine mit dem Cytoskelett ausgeschlossen werden kann, bleiben die Gründe für die in Membranen verlangsamte Diffusionsgeschwindigkeit weiterhin unklar. Immerhin zeigen diese Versuche aber, daß sich die durch Phosphatidylinositol in der Membran verankerten Proteine in ihrer lateralen Beweglichkeit in der Membran nicht von membranüberspannenden Proteinen unterscheiden.

Ein Grund für die Phosphatidylinositolverankerung eines Proteins in der Plasmamembran könnte sein, daß solchermaßen verankerte Proteine durch eine endogene Phospholipase C spe-

zifisch abgespalten werden können. Eindeutig nachgewiesen wurde ein solches Enzym aber bisher nur in T.brucei (111,122,124,125).

1.11. Glykophosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C

In Trypanosomen wird das membrangebundene mfVSG bei Zellyse schnell von einem membrangebundene Enzym in lösliches sVSG umgewandelt, der Oberflächenmantel wird abgespalten (125). mfVSG und sVSG unterscheiden sich nur in einem 1,2-Dimyristoylglycerin-Rest, der bei der Konversion von dem Phosphatidylinositol, mit dem das mfVSG in der Membran verankert ist, abgespalten wird (siehe Abb. 8). Bei dem Enzym handelt es sich also um eine Phospholipase C (121). Wie gezeigt werden konnte (siehe unten) ist diese Phospholipase C spezifisch für Glykophosphatidyl-inositol und wird daher im folgenden Glykophosphatidylinositol spezifische Phospholipase C (GPI-PLC) genannt. Die Konversion von mfVSG zu sVSG findet nicht nur bei Zellyse statt, sondern kann auch durch Ca^{++} in der Gegenwart des Ionophors A 23287 stimuliert werden. Bei einer solchen Behandlung von Trypanosomen wird der Oberflächenmantel abgespalten (179-181). Inhibiert wird die Konversion von mfVSG zu sVSG durch Zink-, Aluminium-, Cadmium-, und Quecksilberionen, die aber nicht spezifisch die GPI-PLC hemmen, sondern eher wie ein Fixativ wirken (182). Spezifisch inhibiert wird die GPI-PLC durch pCMBS, eine organische Queck-silberverbindung, die auch die Abspaltung des Oberflächenmantels bei Zellyse unterbindet.

1.12. Problemstellung

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, die Funktion der GPI-PLC aufzuklären. Dazu sollte dieses Enzym zum einen gereinigt, charakterisiert und in der Zelle lokalisiert werden, zum anderen sollte untersucht werden, unter welchen physiologischen Bedingungen VSG von der Oberfläche der Trypanosomen abgespalten wird. VSG wird bei der Transformation der bemantelten Blutformen zu unbemantelten procyclischen Zellen ins Medium abgegeben (14,92,95) und möglicherweise ist die GPI-PLC für diesen Vorgang verantwortlich. sVSG findet sich auch im Serum akut infizierter Tiere (183), unklar ist aber, ob dieses VSG von den sich teilenden, schlanken Blutformzellen oder den senescenten "stumpy" Trypanososmen abgegeben wurde. Zur Klärung dieser Frage sollte der "turnover" von VSG bei der in vitro Kultivierung von Trypanosomen gemessen werden.

2. Materialien und Methoden

2.1. Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien sind alphabetisch aufgelistet, die Zahlen in Klammern beziehen sich auf die unten angegebenen Bezugsquellen. Nicht aufgeführte Chemikalien wurden von Merck (Darmstadt) bezogen und waren analysenrein, soweit erhältlich.

cis-Aconitat (18)
Acrylamid (17)
Adenin (17)
Affi-Gel 501 (3)
Aminopterin (18)
Aminosäurenmischung, nicht essentiell (9)
Ampholine (12)
Sepharose (14)
Amplify (1)
Biolyte (3)
Biotin-konjugiertes Schaf anti-Maus Ig G (1, Katalognr. RPN 1001)
Bolton and Hunter Reagenz (1)
Brij 35 (18)
Bromphenolblau (17)
BSA (18)
Casein, vitaminfrei (8)
CHAPS (6)
pCMBS (18)
CM-Cellulose (17)
CNBr-aktivierte DEAE-Cellulose (19)
Decylpolyoxyethylenether (10)
Dithiothreitol (18)
FITC-konjugiertes Ziege anti-Kaninchen Ig G (2)
FITC-konjugiertes Ziege anti-Maus Ig G (11, Katalognr. 115-1503)
FITC-konjugiertes Streptavidin (1)
Fluorocytosin (18)
Freund´s Adjuvans (7)
Glutamin (16)
Guanosin (16)
HEPES (16)
Hydroxylapatit, Bio Gel HT (3)
Hypoxanthin (17)
Iscove´s Medium, incomplete (8)
^{35}S-Methionin (1)
Minimum Essential Medium (9)
Molekulargewichtstandard, ^{14}C (1)
Natriumdodecylsulfat (16)
Na ^{125}J (1)
Natriumbicarbonat (17)
Natriumpyruvat (17)
Nitrocellulose, 0.45 µm Porengröße (16)
Octylglukosid (6)
Ölsäure (15)
(9,10-^{3}H)Ölsäure (1)
Penicillin (17)
Polyethylenglykol 1500 (4, Katalognr. 783 641)
Polylysin (18)
Protein A Sepharose (14)
Protosol (13)
Reacti Gel (3)
RPMI 1640 (9)
Sephadex G 25 (14)
Streptomycin (17)
Threonin (17)
Thymidine (17)
Tosyl-L-Lysin-Chloromethylketon (18)
Triton X-100, speziell gereinigt für die Szintillantionstechnik (17)
Trypsin (18)
Tween 20 (18)
Zwittergent 3-12 (6)

Bezugsquellen:

(1) Amersham, Braunschweig
(2) Bio Merieux, Nürtingen
(3) Bio Rad, München
(4) Boehringer, Mannheim
(5) BRL, Karlsruhe
(6) Calbiochem, Gießen
(7) Difco, Detroit
(8) Flow, Meckenheim
(9) Gibco, Karlsruhe
(10) Imperial Chemical Institute Wilmington, DE
(11) Jackson, bezogen über dianova, Hamburg
(12) LKB, Gräfelfing
(13) NEN, bezogen über DuPont de Nemours, GmbH, Dreieich
(14) Pharmacia, Freiburg
(15) Roth, Karlsruhe
(16) Schleicher&Schüll, Dassel
(17) Serva Heidelberg
(18) Sigma, München
(19) Whatman, bezogen über Vetter, GmbH, Wiesloch

2.2. Medien und Puffer

Baltz-Medium (186): Minimum Essential Medium, ergänzt mit 3.97 g HEPES, 1 g Natriumbicarbonat, 150 mg Glutamin, 24 mg Threonin, 55 mg Natriumpyruvat, 0.5 g Glukose, 7 mg Hypoxanthin, 2 mg Thymidin, 10.7 mg Adenosin, 0.2 mM 2-Mercaptoethanol, 5 ml nicht essentielle Aminosäuren, 5ml Penicillin-Streptomycin auf 500 ml.

Citrat-Antikoagulans: 0.1 mM Trinatriumcitrat, 40 mM Glukose, pH 7.4

DTM-Medium: Minimum Essential Medium ohne Glukose und ohne Natriumbicarbonat, ergänzt mit 5.5 mM Prolin, 10 mM Glycerin, 5 ml Penicillin-Streptomycin, und 7.5 mg Hämin auf 500 ml.

Einbaumedium IM I: entspricht Trypanosomenmedium ohne Methionin.

Einbaumedium IM II: Iscove's Medium, ohne Transferrin und ohne Sojabohnen Lecithin, mit 5 mg/ml BSA, 5 µM Adenosin, 20 µM Guanosin, 10 µM Thymidin, und 20 µM Cytosin.

Einfriermedium: 2 Teile HT-Medium + 2 Teile FCS + 1 Teil DMSO

HAT-Medium: RPMI 1640, ergänzt mit 4 mM Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat, 10 mM HEPES, 0.05 mM Mercaptoethanol, 25 mM Natriumbicarbonat, 100 µM Hypoxanthin, 400 nM Aminopterin, 16 µM Thymidin, 10 µg/ml Fluorocytosin, 100 Einheiten Penicillin-Streptomycin auf 500 ml.

HT-Medium: entspricht HAT-Medium ohne Aminopterin.

Phosphat gepufferte Saline (PBS): 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8 mM Na_2HPO_4, 1.4 mM KH_2PO_4, pH 7.4.

SB-Puffer (Seperation-Buffer): 3 mM KH_2PO_4, 60 mM Na_2HPO_4, 45 mM NaCl, 50 mM Glukose, pH 8.0.

TDB (Trypanosome Dilution Buffer): 5 mM KCl, 80 mM NaCl, 1 mM $MgSO_4$, 20 mM Na_2HPO_4, 2 mM NaH_2PO_4, 20 mM Glukose, pH 7.4.

Trypanosomenmedium (187): Minimum Essential Medium, ergänzt mit 3.97 g HEPES, 150 mg Glutamin, 55 mg Na-Pyruvat, 1 g Glukose, 7 mg Hypoxanthin, 5 ml nicht essentielle Aminosäuren, 5 ml Penicillin-Streptomycin auf 500 ml.

Vogel Bonner Mineralsalz Medium: wie beschrieben bei Vogel and Bonner, 1956 (188).

2.3. Trypanosomen

Die monomorphen Trypansomenklone MiTat 1.2 und MiTat 1.4 von Trypanosoma brucei wurden freundlicherweise von Dr. G.A.M. Cross (15) zur Verfügung gestellt, der pleomorphe Klon AnTat 1.1 von Dr. Le Ray (189), der daraus abgeleitete Klon AnTat 1.8 von Dr. P. Overath.

2.4. Aufbewahrung von Trypanosomen

Das Blut infizierter Mäuse wurde 1:2 mit TDB, 20% Glycerin, verdünnt, in Hematokritröhrchen eingeschmolzen und über Nacht über flüssigem Stickstoff gelagert. Anschließend wurden die Stabilate in flüssigen Stickstoff eingetaucht. Auf diese Art und Weise können Trypanosomen mehrere Jahre aufbewahrt werden. Bei Bedarf wird ein Stabilat geöffnet, das Blut mit 1 ml TDB vermischt und intraperitoneal in Mäuse injiziert.

2.5. Ernten von Trypanosomen aus dem Blut infizierter Mäuse

Infizierten Mäusen wurde unter Etheranästhesie der Brustkorb geöffnet und die untere Hohlvene durchtrennt. Das Blut wurde entnommen und mit ungefähr einem Zehntel seines Volumens Citrat-Antikoagulans vermischt und auf Eis gestellt. Steril wurde das Blut durch Herzpunktion entnommen. Nach dem Verdünnen des Blutes mit eiskaltem TDB, ungefähr 1:2, wurde es für 20 Min. bei 1200 UpM (230 g) in einer Christ Minifuge GL bei 0°C zentrifugiert. Anschließend wurde mit einer Pasteurpipette zuerst das Serum abgenommen, dann die Trypanosomenschicht über dem Erthrocytenniederschlag.

2.6. Ernten von Trypansosomen aus dem Blut infizierter Ratten

10 Ratten (ca. 300 g) wurden intraperitoneal je 2×10^7 Trypanosomen injiziert. Nach drei Tagen wurde ihnen unter Etheranästhesie der Brustkorb geöffnet und die untere Hohlvene durchtrennt. Das Blut wurde entnommen, mit ungefähr einem Zehntel seines Volumens mit Citrat-Antikoagulans verdünnt und auf Eis gestellt. Nach Zentrifugation für 15 Min. bei 2200 UpM (750 g) in einer Christ Minifuge GL bei 0°C wurde zuerst das Serum abgenommen und dann die Trypanosomenschicht über dem Erythrocytenniederschlag. Um so viel wie möglich der verbliebenen Trypanosomen zu entnehmen, wurde SB-Puffer zugegeben und wieder abgenommen. Die gesammelten Trypanosomen wurden 10 Min. bei 2200 UpM bei 0°C zentrifugiert, in 20-30 ml SB-Puffer resuspendiert und zur Trennung von Erythrocyten auf eine 100 ml DEAE-Cellulose Säule (4 x 8 cm) aufgetragen, die mit eiskaltem SB-Puffer äquilibriert worden war. Die DEAE Säule wurde mit ungefähr 100 ml SB-Puffer gewaschen, wobei ein leichtes Vakuum an die Säule angelegt wurde. Die Trennung der Trypanosomen von den Erythrocyten erfolgte innerhalb von 15 Min. bei RT, sodaß sich der Puffer auf höchstens 10°C erwärmte. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden die Trypanosomen 5 Min. bei 5000 UpM (4080 g) in einem Sorvall GSA Rotor bei 0°C zentrifugiert und weiterverarbeitet.

2.7. (^{35}S)-Methionin Einbau

2×10^6 Trypanosomen aus dem Blut infizierter Mäuse wurde zweimal in Einbaumedium IM I gewaschen, in 100 µl IM I mit 10 µCi (^{35}S)-Methionin (1300 Ci/mmol) 30 Min. bei 37°C inkubiert, und zweimal in Trypanosomenmedium gewaschen.

2.8. (9,10-^{3}H)Myristinsäure Einbau

2×10^6 Trypanosomen aus dem Blut infizierter Mäuse wurden zweimal in Einbaumedium IM II gewaschen, in 100 µl IM II mit 5 µCi (9,10-^{3}H)Myristinsäure (58 Ci/mmol) 2-3 h bei 37°C inkubiert, und zweimal in TDB gewaschen. Das Toluol, in dem die Säure gelöst war, wurde vor Zugabe des Mediums vollständig durch Überblasen mit Stickstoff verdampft.

2.9. Kultivierung von Blutformzellen und Bestimmung des VSG turnover

Der "turnover" des VSG wurde in einem "pulse-chase" Experiment bestimmt. Dazu wurden 1.4×10^6 Trypanosomen, die zuvor mit (^{35}S)-Methionin radioaktiv markiert worden waren (siehe Abschnitt 2.7.), entweder in 7 ml TM-Medium, 15% iPS über einer Fibroblasten Fütterzellschicht (Flow 7000) bei 37°C, 4% CO_2, 96% Luft kultiviert, oder ohne Fütterzellschicht in 7 ml Baltz-Medium, 15% iFCS. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde genau 1 ml der Kultur entnommen, 4 Min. in einem Eppendorfzentrifuge zentrifugiert, und die Zellen in 100 µl PBS, 10 mg/ml Zwittergent 3-12, lysiert. Das VSG im Überstand und im Zellysat wurde mit 5 µl anti-VSG Antiserum und *Staphylococcus aureus* Zellen immunpräzipitiert, wie in Abschnitt 2.25. beschrieben.

2.10. Transformation

Die *in vitro* Transformation von Blutformzellen wurde nach Czichos *et al.* (97) durchgeführt. Die Parasiten wurden 16-20 h in

Trypanosomenmedium, 15% iPS bei 37°C über einer Fibroblasten Fütterzellschicht (Flow 7000) in 4% CO_2, 96% Luft kultiviert und anschließend, nach Zugabe von 300 µl CCA (0.1 M Citrat, 0.1 M cis-Aconitat, 0.2 M Magnesiumacetat, pH 7.0) zu 10 ml Medium, auf 27°C überführt. Zur Bestimmung der GPI-PLC Aktivität wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Zellen steril entnommen, gezählt, 4 Min. in einer Eppendorf zentrifuge zentrifugiert, einmal in 1 ml TDB gewaschen, und entsprechend 10^9 Zellen/ml in 50 mM HEPES, pH 7.0, 10 mg/ml Decylpolyoxyethylenether oder 10 mg/ml Triton X-100 lysiert und bei -20°C eingefroren. Nach dem Auftauen wurden alle Proben 5 Min. in der Eppendorfzentrifuge zentrifugiert und die Aktivität der GPI-PLC im Überstand bestimmt, wie in Abschnitt 2.13. beschrieben.

Um bemantelte und unbemantelte Zellen zu trennen wurden 8 x 10^7 Zellen in 1 ml Trypanosomenmedium mit 100 µl hitze-inaktiviertem anti-VSG Hasenantiserum bei 0°C 30 Min. inkubiert und dann auf eine Protein A 6MB Säule (2 ml) aufgetragen (2 ml/h). Die Zellen im Durchlauf wurden zentrifugiert, für die Immunfluoreszenz fixiert oder lysiert, um die GPI-PLC Aktivität zu bestimmen.

Der Abwurf des Oberflächenmantels während der Transformation wurde gemessen, indem die Trypanosomen mit (^{35}S)-Methionin radioaktiv markiert (siehe Abschnitt 2.7.) und in einem wie oben beschriebenen Transformationsexperiment eingesetzt wurden. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde 1 ml Medium entnommen, 4 Min. in einer Eppendorfzentrifuge zentrifugiert, und die Zellen in 100 µl PBS, 10 mg/ml zwittergent 3-12 lysiert. Das VSG im Überstand und im Zellysat wurde mit 5 µl anti-VSG Antiserum und Staphylococcus aureus Zellen immunpräzipitiert, wie in Abschnitt 2.25. beschrieben

2.11. sVSG-Präparation

Von Erythrocyten abgetrennte Trypanosomen aus dem Blut infizierter Ratten (siehe Abschnitt 2.6.) wurden bei einer Dichte von 10^9 Zellen/ml in eiskaltem 0.2 mM $ZnCl_2$, 0.1 mM TLCK, lysiert, 5 Min. in Eiswasser gestellt, 5 Min. bei 5000 UpM (4080 g) in einem Sorvall GSA Rotor zentrifugiert, und im gleichen Volumen 10 mM KPP, 0.1 mM TLCK, pH 8.0, 45°C resuspendiert. Nach 3 Min. bei RT wurde die Suspension auf 0°C abgekühlt und 60 Min. bei 100 000g zentrifugiert. Der Überstand eines Lysats von 10^{11} Trypanosomen wurde auf eine DEAE-Cellulose Säule (0.5 x 15 cm) aufgetragen, die mit 10 mM KPP, pH 8.0 äquilibriert worden war. Anschließend wurde die Säule mit dem gleichen Puffer gewaschen, die OD_{280} des Durchlaufs bestimmt, und die Fraktionen des ersten Gipfels vereinigt. Eine Isoelektrofokussierung der Proteine wurde in einem granulierten Flachbett durchgeführt. Dazu wurden 4 g Polyacrylamidgel (Biolyte) über Nacht in destilliertem Wasser gequollen und nach dem Absaugen des Wassers mit dem DEAE-Säulendurchlauf vermischt. Nach Zugabe von 4 ml Ampholinen pH 3.5-10 wurde die Mischung im Flachbett bei 37°C auf 50 g Endgewicht getrocknet. Die Proteine wurden bei 5 W (konstant) und 1500 V (maximal) bei 10°C über Nacht fokussiert, die VSG haltigen Banden aus dem Gel geschnitten und nach dem Abfiltern des Gelmaterials durch Ultrafiltration mit einer Amicon PM 10 Membran von den Ampholinen getrennt und anschließend lyophilisiert. In einem Polyacrylamidgel waren nach elektrophoretischer Auftrennung der Proteine und anschließender Silberfärbung außer VSG keine weiteren Proteinbanden zu sehen. Aus 10^{11} Trypanosomen wurden 30-40 mg VSG isoliert.

2.12. mfVSG-Präparation

8×10^8 mit (9,10-^{3}H)Myristinsäure radioaktiv markierte Trypanosomen (siehe Abschnitt 2.8.) wurden in 8 ml PBS, 10 mg/ml Octylglukosid, 0.1 mM TLCK, 10 mM pCMBS bei 0°C lysiert. Das Zellysat wurde für 20 Min. bei 10 000 UpM (8000 g) in einem Sorvall SS-34 Rotor bei 0°C zentrifugiert und bei 4°C auf eine 15 ml anti-MiTat 1.4-VSG Antikörpersäule (40 mg IgG, siehe Abschnitt 2.23.) aufgetragen (2-3 ml/h). Die Säule wurde über Nacht bei 4°C mit PBS, 10 mg/ml Triton X-100 gewaschen und das gebundene mfVSG mit 0.2 M Glycin, pH 2.5, 1 mg/ml Triton X-100 bei einer Flußrate von 20 ml/h eluiert. Das Eluat wurde sofort mit 1 M Tris-Cl, pH 8.0, 1 mg/ml Triton X-100 neutralisiert, radioaktive Fraktionen vereinigt und über Nacht gegen PBS, 1 mg/ml Triton X-100, dialysiert. Nach Polyacrylamidgelelektrophorese in der Gegenwart von Natriumdodecylsulfat war auf dem Gel nur eine radioaktive Bande zu sehen, wie es für mfVSG von T.brucei charakteristisch ist. Eine typische Präparation enthielt 4-6 x 10^4 cpm/µg mfVSG, die Ausbeute war ungefähr 1.5 µg.

2.13. Bestimmung der GPI-PLC Aktivität

0.3-0.5 µg gereinigtes (^{3}H)Myristoyl-mfVSG (4-6 x 10^4 cpm/µg) wurde mit GPI-PLC in 200 µl 50 mM HEPES, 2.5 mM EDTA, pH 7.0, 0.5 mM Dithiothreitol, 1 mg/ml Triton X-100 30 Min. bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 50 µl 20% Essigsäure gestoppt und die abgespaltene Radioaktivität mit 500 µl Hexan: Isopropanol (3:2) extrahiert. Die Radioaktivität in 200 µl der organischen Phase (2/3 des Gesamtvolumens der organischen Phase) wurde gemessen und die umgesetzte Menge mfVSG berechnet.

2.14. Reinigung der GPI-PLC

2.14.1. Herstellen eines Detergensextraktes

10^{11} Trypanosomen aus dem Blut infizierter Ratten wurden von Erythrocyten getrennt, wie in Abschnitt 2.6. beschrieben, und in 100 ml 5 mM HEPES, 2.5 mM EDTA, 0.1 mM TLCK, pH 7.0 bei 0°C lysiert. Das Lysat wurde 10 Minuten bei 10 000 UpM (12 000 g) in einem Sorvall SS 34 Rotor bei 5°C zentrifugiert, der Niederschlag mit einem Zellpotter im selben Volumen 20 mM HEPES, 2,5 mM EDTA, pH 7.0 resusupendiert und 60 Min. in einem Beckman 60 Ti Rotor bei 40 000 UpM (100 000 g) bei 5°C zentrifugiert. Der Niederschlag wurde noch einmal im selben Puffer gewaschen und in 50 ml 20 mM HEPES, 2.5 mM EDTA, pH 7.0, 10 mg/ml oder 40 mg/ml Triton X-100 resuspendiert, abhängig von der Weiterverarbeitung des Detergensextraktes. Für die Elektrofokussierung wurde ein Extrakt mit 40 mg/ml Triton X-100, für die Reinigung mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers wurde ein Extrakt mit 10 mg/ml Triton X-100 verwendet. Nicht solubilisiertes Material wurde durch Ultrazentrifugation entfernt (60 Min., 100 000 g).

2.14.2. Elektrofokusierung in einer 110 ml LKB Säule

Der Detergensextrakt wurde in Gegenwart von 40 mg/ml Triton X-100 in einer 110 ml LKB Säule bei 10°C für 60 h bei 2000 V (maximal) und 15 W (konstant) fokussiert (190). Dabei befand sich die Anode oben, für die Stabilisierung des Gradienten wurde Sorbit verwendet (siehe Tabelle 2). Nach 60 h wurde die Säule unten geöffnet und entleert, wobei 5 ml Fraktionen gesammelt wurden. Der pH Gradient wurde mit einer pH Elektrode gemessen

und die GPI-PLC Aktivität der einzelnen Fraktionen bestimmt, wie in Abschnitt 2.13. beschrieben.

Tabelle 2

Lösungen für den Dichte-Gradienten in einer 11o ml LKB Säule

	Dichte Lösung	Leichte Lösung
Sorbit	27 g	2.7 g
Arginin	0.5 g	-
Detergensextrakt	-	50 ml
Ampholine pH 9-11	1.3 ml	-
Ampholine pH 7-9	-	2.6 ml
Triton X-100	2.2 ml	-
H_2O	ad 54 ml	ad 54 ml

Elektrodenlösungen

	Kathode	Anode
Sorbit	15 g	-
-Alanin	-	0.5 g
Triton X-100	-	0.4 ml
H_2O	10 ml	10 ml
1M NaOH	6 ml	-

2.14.3. Affinitätschromatographie mit Affi Gel 501

Nach der Elektrofokussierung wurden die aktiven Fraktionen vereinigt und auf eine 20 ml Affi Gel 501 Säule, äquilibriert mit 20 mM HEPES, 2.5 mM EDTA, pH 6.5, 20% Glycerin, 10 mg/ml Triton X-100, mit einer Flußrate von 5 ml/h bei RT aufgetragen. Nach dem Waschen der Säule mit zwei Säulenvolumen 20 mM HEPES, 2.5 mM EDTA, 0.2 M NaCl, pH 6.5, 20% Glycerin, 10 mg/ml Triton X-100 und zwei Säulenvolumen 20 mM HEPES, 2.5 mM EDTA, pH 6.5, 20 % Glycerin, 1 mg/ml Triton X-100 wurde die Säule mit 10 mM Dithiothreitol im gleichen Puffer eluiert. Da die GPI-PLC von dieser Affinitätssäule nur langsam eluierte, wurde die Elution, nachdem 20 ml Elutionspuffer über die Säule gelaufen war, für 30 Min.

unterbrochen und dann mit einer Flußrate von 20 ml/h wieder aufgenommen. Fraktionen, die GPI-PLC enthielten, wurden gesammelt und auf eine CM-Cellulose Säule aufgetragen.

2.14.4. Ionenaustauschchromatographie auf CM-Cellulose

Nach dem Äquilibrieren einer 3 ml CM-Cellulose Säule mit 20 mM HEPES, 2.5 mM EDTA, pH 6.5, 20% Glycerin, 1 mg/ml Triton X-100 wurde das Eluat der Affi Gel 501 Säule bei RT aufgetragen und anschließend mit einem 0-0.3 M NaCl Gradienten bei einer Flußrate von 2 ml/h eluiert. Fraktionen, die GPI-PLC enthielten, wurden gesammelt und bei -20°C aufbewahrt.

2.14.5. Reinigung der GPI-PLC auf einer Antikörper-Affinitätssäule

0.5 ml Reacti Gel, an das 0.85 mg gereinigter anti-GPI-PLC monoklonaler Antikörper mAT 3 gekoppelt war, wurde in einer Pasteurpipette 10 Min. mit NaPP, pH 11.0 (50 ml 50 mM Na_2HPO_4 + 4.1 ml 0.1 M NaOH), 10 mg/ml Triton X-100 gewaschen und anschließend mit 20 mM HEPES, 2.5 mM EDTA, pH 7.0, 10 mg/ml Triton X-100 äquilibriert. Nachdem ein Detergensextrakt aus 10^{11} Trypanosomen mit einer Flußrate von 2 ml/h bei 4°C aufgetragen worden war, wurde die Säule mit 1 ml NaPP, pH 11.0, 10 mg/ml Triton X-100, 4 ml 100 mM HEPES, 2.5 mM EDTA, pH 7.0, 1 mg/ml Triton X-100 und 4 ml 20 mM HEPES, 2.5 mM EDTA, pH 7.0, 1 mg/ml Triton X-100 bei 4°C gewaschen (30 ml/h). Die gebundene GPI-PLC wurde mit NaPP, pH 12.0 (50 ml 50 mM Na_2HPO_4 + 27 ml 0.1 M NaOH), 1 mg/ml Triton X-100 bei 4°C eluiert. Nachdem 0.5 ml Elutionspuffer über die Säule gelaufen waren, wurde die Elution für genau

2 Min. unterbrochen. Dann wurden 0.5 ml Fraktion gesammelt (1 ml/Min.), die sofort mit 0.2 ml 1 M Tris-HCl, pH 6.8, 1 mg/ml Triton X-100 neutralisiert wurden. Die Fraktionen, die GPI-PLC enthielten, wurden vereinigt und bei -20°C aufbewahrt.

2.15. Rekonstitution von mfVSG und GPI-PLC in Phospholipid Vesikel

Für die Rekonstitution von mfVSG und GPI-PLC in Phospholipid Vesikel wurden mfVSG beziehungsweise GPI-PLC verwendet, die in der Gegenwart von 10 mg/ml Octylglukosid anstelle von Triton X-100 gereinigt worden waren. Bei der Reinigung von mfVSG (siehe Abschnitt 2.12.) wurde in allen Reinigungsschritten 10 mg/ml Octylglukosid anstelle von Triton X-100 verwendet. Bei der Reinigung der GPI-PLC wurde das Triton X-100 nach dem Auftragen des Detergensextraktes durch Octylglukosid ersetzt. Alle Puffer, die zum Waschen und Eluieren der Säule verwendet wurden, enthielten anstelle von Triton X-100 10 mg/ml Octylglukosid. Gereinigtes Gesamtphospholipid von Escherichia coli (191) wurde freundlicherweise von Dr. J.K. Wright, Tübingen, zur Verfügung gestellt und in Benzol gelöst bei -20°C aufbewahrt. 4 mg Lipid wurde unter einem Stickstoffstrom getrocknet, in Diethylether aufgenommen, nochmals getrocknet und 1 h bei 37°C aufbewahrt. Um Spuren von organischem Lösungsmittel zu entfernen, wurde das Lipid anschließend 3 h lyophilisiert, in 200 µl PBS, 40 mg/ml Octylglukosid aufgenommen und entweder mit 50 µg gereinigtem mfVSG oder 5 µg gereinigter GPI-PLC vermischt. Das Detergens wurde durch Dialysieren gegen 1 l PBS, 2.5 mM EDTA, 1 mM Mercaptoethanol für 12 h bei 4°C entfernt. Die entstandenen Proteoliposomen wurden zentrifugiert, einmal in PBS, 2.5 mM EDTA, 1 mM

Mercaptoethanol gewaschen (100 000 g, 2 h, 5°C) und in 0.5 ml des selben Puffers resuspendiert. Bei der Rekonstitution gingen 10% mfVSG beziehungssweise 50% der GPI-PLC Aktivität verloren.

Die Konversion von (^{3}H)Myristoyl-mfVSG zu sVSG in Phospholipidvesikeln oder Phospholipid-Detergensmicellen wurde gemessen, indem 5 µl (^{3}H)Myristoyl-mfVSG haltige Vesikel mit unterschiedlichen Mengen GPI-PLC haltigen Vesikeln in 60 µl PBS, 2.5 mM EDTA, 1 mM Mercaptoethanol, mit und ohne 10 mg/ml Triton X-100, gemischt wurden. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 50 µl 20% Essigsäure gestoppt.

Phospholipidvesikel wurden durch zweimaliges Einfrieren bei -20°C und Auftauen bei 0°C einer Suspension von 50 µl (^{3}H)Myristoyl-mfVSG haltigen Vesikeln und 5 µl GPI-PLC haltigen Vesikeln fusioniert. Die Reaktion wurde gestartet, indem 5 µl der fusionierten Vesikel nach dem Auftauen bei 0°C in 50 µl PBS, 2.5 mM EDTA, 1 mM Mercaptoethanol, mit und ohne 10 mg/ml Triton X-100 bei RT pipettiert wurden. Die Reaktion wurde in 30 s Intervallen, wie oben beschrieben, abgestoppt.

2.16. Trypsinverdau der GPI-PLC

2×10^8 Trypanosomen der Variante MiTat 1.2 (221) wurden intakt oder nach osmotischer Lyse in H_2O in 2 ml IM II aufgenommen und mit 50 µg/ml Trypsin bei 37°C inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden 100 µl entnommen und mit 1 ml IM II, 0.1 mM PMSF, 1 mM TLCK, 10% Schafserum, 0°C vermischt und 5 Min. in einer Eppendorfzentrifuge zentrifugiert. Die intakten Zellen wurden nun in Wasser lysiert und nochmals zentrifugiert. Anschließend wurde der Niederschlag in 500 µl 50 mM HEPES, 2.5 mM EDTA, 0.5 mM DTT, pH 7.0, 1 mg/ml Triton X-100 resuspendiert und

die GPI-PLC Aktivität bestimmt, wie in Abschnitt 2.13. beschrieben.

2.17. Saccharosedichtegradientenzentrifugation von Trypanosomenmembranen

Die Untersuchung der GPI-PLC Aktivität in Trypanosomenmembranen, die auf einem Saccharosegradienten aufgetrennt worden waren, wurde in Zusammenarbeit mit Fred Opperdoes, Brüssel, durchgeführt. Dazu wurden von F. Opperdoes Trypanosomenmembranen hergestellt und auf einem Saccharosegradienten aufgetrennt (192,193).

2.18. Test für Antikörper gegen die GPI-PLC

Ein Detergensextrakt aus Membranen wurde hergestellt wie in Abschnitt 2.14.1. beschrieben. 0.4 µl dieses Extrakts wurden zusammen mit 20 µl Serum oder Hybridomaüberstand in verschiedenen Verdünnungen in 70 µl PBS, 2.5 mM EDTA, 5 mg/ml Triton X-100 60 Min. bei RT inkubiert. Nach der Zugabe von 100 µl Formalin-fixierten, Hitze-behandelten, Staphylococcus aureus Zellen (10% Suspension in PBS, 2.5 mM EDTA, 5 mg/ml Triton X-100, Bindungskapazität für menschliches IgG 10-12 µg/mg) wurde die Suspension weitere 30 Min. inkubiert, zentrifugiert, und 50 µl des Überstandes auf GPI-PLC Aktivität getestet (siehe Abschnitt 2.13.).

2.19. Herstellen von Hybrid Zellinien

Die Myeloma Zellinie P3-NS1-1-Ag4-1 (im folgenden NS-1 genannt, 194), freundlicherweise von Dr.C.Dreyer, Tübingen, zur

Verfügung gestellt, wurde in HT-Medium, 15% iFCS kultiviert. Die Zellfusion wurde durchgeführt, wie von C. Dreyer beschrieben (195), mit dem Unterschied, daß peritoneale Makrophagen aus Mäusen als Fütterzellen verwendet wurden. Die Makrophagen wurden einen Tag vor der Fusion zwei Mäusen steril entnommen und auf sechs Mikrotiterplatten in 100 µl HAT-Medium, 15% iFCS pro Loch verteilt.

Vor der Zellfusion wurde das Serum der immunisierten Mäuse auf seinen Gehalt an Antikörpern gegen die GPI-PLC getestet, wie in Abschnitt 2.16. beschrieben. Die Milz der Maus mit dem höchsten Antikörpertiter wurde steril entnommen und in Medium ohne Serum überführt. Nach dem Entfernen von Fett und Bindegewebe wurde die Milz mit Hilfe zweier Pinzetten durch Ausstreifen in Einzelzellen zerlegt. Die Milzzellen wurden gezählt, in HT-Medium ohne Serum gewaschen, mit zehn Mal weniger gewaschenen NS-1 Zellen vermischt und 15 Min. bei 600 g und RT zentrifugiert. Nach dem restlosen Entfernen des Überstandes wurden 0.5 ml Polyethylenglykol 1500, vorgewärmt auf 37°C, zugegeben, die Zellen vorsichtig durch Rühren mit einer Pipette resuspendiert und 60 Sekunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden im Verlauf von fünf Min. 20 ml HT-Medium ohne Serum, vorgewärmt auf 37°C, zugegeben. Die Zellen wurden fünf Min. bei 600 g zentrifugiert, in 60 ml HAT-Medium, 15% iFCS, 37°C aufgenommen und auf sechs mit Makrophagen beschichtete Mikrotiterplatten ausgesät. Die Zellen wurden bei 37°C in 4% CO_2, 96% Luft inkubiert und nach einer Woche mit HT-Medium, 15% iFCS gefüttert. Nach zwei bis drei Wochen wurde der Überstand solcher Kolonien, die mit bloßem Auge sichtbar waren, auf Antikörper gegen die GPI-PLC getestet (siehe Abschnitt 2.16.). Hybridomas, die spezifische Antikörper sekretierten, wurden zweimal durch "limiting dilution" in HT-Medium kloniert. Dazu

wurden die Zellen in einer Konzentration von 10 Zellen/Loch, 3 Zellen/Loch und 0.5 Zellen/ Loch auf Makrophagen beschichtete Mikrotiterplatten ausgesät. Der Überstand sichtbarer Klone wurde wieder auf Antikörper gegen die GPI-PLC getestet. Subklonierte Zellen wurden eingefroren und in flüssigem Stickstoff gelagert, beziehungsweise als Tumor in Balb/c Mäusen etabliert. Nach einer Fusion wurden drei Klone mAT 1, mAT 2, mAT 3, die Antikörper gegen die GPI-PLC produzieren, isoliert.

2.20. Einfrieren und Auftauen von Hybrid Zellen

Zum Einfrieren wurden 1-2 x 10^6 Zellen zentrifugiert, in 1 ml HT-Medium, 15% iFCS resuspendiert und auf Eis gestellt. Im Abstand von 10 Min. wurden drei Mal 0.33 ml Einfriermedium, 0°C zugegeben und die Zellen in einer Styroporpackung bei -70°C eingefroren. Nach 24 h wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt.

Nach dem Auftauen bei 37°C wurden die Zellen mit 5 ml HT-Medium, 15% iFCS vermischt, 5 Min. mit 600 g bei RT zentrifugiert, in HT-Medium, 15% iFCS resuspendiert und auf 3 Löcher einer mit Makrophagen beschichteten Costar 24-Loch Platte ausgesät. Nach mehreren Tagen konnten die Zellen auch ohne Fütterzellen kultiviert werden.

2.21. Immunisierung von Mäusen und Kaninchen

Die Antigene wurden entweder mit kompletten beziehungsweise inkompletten Freund's Adjuvans emulgiert, oder ohne Adjuvans, intraperitoneal in Balb/c Mäuse injiziert. Kaninchen wurden intradermal an mehreren Stellen auf dem Rücken, an den Flanken

des Tieres und intramuskulär in die hinteren Oberschenkel injiziert. Die Immunisierungsprotokolle sind in Tabelle 2 zusammengefaßt. Zur Bestimmung des Antikörpertiters wurden die Mäuse aus der Schwanzvene geblutet, Kaninchen aus der Ohrvene.

Tabelle 3: Immunisierung von Mäusen und Kaninchen

Tier	Tag	Antigen	Menge (µg)	Adjuvans[x°]	Applikation[x]
Kaninchen	1	VSG	500	CFA	i.d.
	21	VSG	500	ICFA	i.m.
Balb/c Maus	1	1000-fach	2.5	CFA	i.p.
	18	angereicherte	2.5	ICFA	i.p.
	32	GPI-PLC	2.5	ICFA	i.p.
	46		2.5	-	i.p.
	60		2.5	-	i.p.
	63		2.5	-	i.p.
	64		2.5	-	i.p.
	65		2.5	-	i.p.
Balb/c bzw. NMRI Maus	1	GPI-PLC	2	CFA	i.p.
	21		2	ICFA	i.p.
	31		2	ICFA	i.p.
	41		2	-	i.p.
	51		2	-	i.p.
	61		2	-	i.p.

X: i.d. = intradermal, i.p. = intraperitoneal, i.m. = intramuskulär.
X°: CFA = Complete Freund´s Adjuvans, ICFA = Incomplete Freund´s Adjuvans.

2.22. Antiseren

Nach 60 Min. bei RT wurde geronnenes Blut über Nacht bei 4°C aufbewahrt. Das abgenommene Serum wurde 20 Min. bei 1000 g zentrifugiert, beziehungsweise bei kleineren Mengen 5 Min. in der Eppendorfzentrifuge, und anschließend bei -70°C eingefroren. Die Qualität des anti-VSG Antiserums wurde durch Immunfluorescenz (Abschnitt 2.28.) getestet, anti-GPI-PLC Antiserum im Test für Antikörper gegen die GPI-PLC (Abschnitt 2.16.).

2.23. Reinigung von IgG aus Kaninchenserum und Kopplung an CNBr-aktivierte Sepharose

Zu 100 ml Antiserum wurden innerhalb von 30 Min. unter ständigem Rühren 25 g Ammoniumsulfat zugegeben und das ausgefallene Protein anschließend 20 Min. bei 10 000 UpM (12 000 g) in einem SS 34 Sorvall Rotor zentrifugiert. Der Niederschlag wurde in 20 ml 20 mM KPP, pH 8.0 resuspendiert und über Nacht gegen den selben Puffer dialysiert. Das Dialysat wurde auf eine DEAE-Cellulose Säule (1.5 x 12 cm) aufgetragen, die mit 20 mM KPP, pH 8.0 äquilibriert worden war. Die Säule wurde mit dem selben Puffer gewaschen (25 ml/h), der Durchlauf in 5 ml Fraktionen gesammelt und die OD_{280} der einzelnen Fraktionen bestimmt. Die Fraktionen des ersten Gipfels wurden vereinigt, und zwar bis zu der Fraktion, deren OD_{280} ungefähr halb so groß war, wie die der Gipfelfraktion. Der IgG Gehalt wurde anhand der OD_{280} bestimmt, wobei OD_{280}=1,45 ml^{-1} cm^{-1} einer Ig G Konzentration von 1 mg/ml entspricht. Eine typische Präparation ergab 5-7 mg pro ml Antiserum.

45 mg gereinigtes IgG wurde über Nacht gegen Kopplungspuffer (0.1 M $NaHCO_3$, 0.5 M NaCl, pH 8.0) dialysiert und zusammen mit 5 g CNBr-aktivierter Sepharose, die zuvor 15 Min. mit 1 l 1 mM HCL gewaschen worden war, 3 h bei RT geschüttelt. Der Kopplungsvorgang wurde durch Messen der OD_{280} des Überstandes verfolgt. Nach Zugabe von 50 ml 0.2 M Glycin, 0.5 M NaCl, pH 8.0 wurde nochmals 2 h bei RT geschüttelt und anschließend zweimal mit 200 ml 0.1 M NaAcetat, 0.5 M NaCl, pH 4.5 und mit 200 ml Kopplungspuffer gewaschen.

2.24. Reinigung monoklonaler Antikörper aus Ascitesflüssigkeit und Kopplung an Reacti Gel

Zur Produktion von Ascitesflüssigkeit wurden 1-2 x 10^6 Hybridomazellen intraperitoneal in eine Balb/c Maus injiziert, der 14 Tage zuvor 0.5 ml Pristan injiziert worden war. Nach ungefähr 10 Tagen konnte die Ascites Flüssigkeit entnommen werden, die nach Zentrifugation für 10 Min. bei 1000 g bei -70°C eingefroren beziehungsweise zur Isolierung von monoklonalen Antikörpern verwendet wurde (196). Dazu wurden 5 ml Ascites Flüssigkeit auf eine 12 ml Hydroxylapatit (Bio Gel HT) Säule, die mit 10 mM NaPP, pH 6.8 äquilibriert worden war, aufgetragen (12 ml/h) und an die Säule gebundenes Protein mit einem 10-300 mM NaPP Gradienten eluiert. Die OD_{280} des Eluats wurde bestimmt, die Antikörper enthaltenden Fraktionen vereinigt und bei -70°C aufbewahrt.

Die gereinigten monoklonalen Antikörper wurden an Reacti Gel gekoppelt. Nach Dialyse über Nacht gegen 0.1 M Borat, pH 8.5 wurden 25 mg Antikörper zusammen mit 5 ml Reacti Gel, das zuvor mit eiskaltem H_2O gewaschen worden war, für 72 h bei 4°C geschüttelt. Eine Bestimmung des Proteingehalts im Überstand ergab, daß 17 mg an das Gel gekoppelt wurden. Vor dem Gebrauch wurde das Säulenmaterial gewaschen, wie in Abschnitt 2.14.5. beschrieben.

2.25. Immunpräzipitation von (^{35}S)-Methionin markiertem VSG

Die Immunpräzipitation von VSG wurde so durchgeführt, wie die von Kessler (197,198) beschriebene Methode von Holder und Freeman (199) modifiziert wurde.

1 ml einer (^{35}S)-VSG haltigen Lösung wurden mit 10 µl normalem

Kaninchenserum und 100 µl S.aureus Zellen 30 Min. bei RT inkubiert und anschließend zentrifugiert. Der Überstand wurde in zwei Aliquots geteilt und nach Zugabe von je 5 µl anti-VSG Antiserum 60 Min. bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 50 µl einer 10% (w/v) Suspension von S.aureus Zellen wurde nochmals 30 Min. inkubiert und dann zentrifugiert. Die S.aureus Zellen wurden vier Mal in PBS, 1.5 mg/ml zwittergent 3-12 gewaschen und in 4% Natriumdodecylsulfat gekocht. Anschließend wurde die präzipitierte Radioaktivität bestimmt beziehungsweise die präzipitierten Proteine elektrophoretisch aufgetrennt und fluorographisch nachgewiesen.

2.26. Jodierung und Immunpräzipitation der GPI-PLC

Die gereinigte GPI-PLC wurde mit Bolton und Hunter Reagenz jodiert, wie vom Hersteller empfohlen (Amersham Buchler, Braunschweig, F.R.G., data sheet 11 437). 25 µl gereinigte GPI-PLC (0.6 µg) wurden mit 2.5 µl 1 M Borat, pH 8.5 vermischt und für 60 Min. bei 0°C mit Bolton und Hunter Reagenz (500 µCi) inkubiert. Nach der Zugabe von 200 µl 0.1 M Borat, 0.2 M Glycin, pH 8.5, 1 mg/ml Triton X-100, wurde für weitere 30 Min. bei 0°C inkubiert. Anschließend wurde jodiertes Protein von anderen Reaktionsprodukten auf einer 10 ml Sephadex G-25 Säule, äquilibriert mit PBS, 0.25% Gelatine, 1 mg/ml Triton X-100, getrennt. Jodiertes Protein wurde vereinigt und mit einem Überschuss monoklonalem Antikörper mAT 1 für 60 Min. bei RT inkubiert. Nach der Zugabe von 50 µl einer 10% (w/v) Suspension von S.aureus Zellen wurde nochmals 60 Min. inkubiert und die S.aureus Zellen fünf Mal in PBS, 1.5 mg/ml Zwittergent 3-12 gewaschen. Die immunprezipitierten Proteine wurden elektrophoretisch aufgetrennt und autoradiographisch nachgewiesen.

Zur Charakterisierung von polyvalentem anti-GPI-PLC Antiserum wurden die Proteine in 10 µl Detergensextrakt aus Trypanosomenmembranen (12 µg; hergestellt wie in Abschnitt 2.14.1. beschrieben) auf die gleiche Art und Weise jodiert, anschließend direkt bei RT mit Antiserum inkubiert und auf ein 100 µl Protein A Sepharose Säule aufgetragen. Die Säule wurde bei RT solange mit PBS, 1.5 mg/ml zwittergent 3-12 gewaschen bis im Durchfluß keine Radioaktivität mehr nachzuweisen war. Anschließend wurde das Säulenmaterial in 4% Natriumdodecylsulfat gekocht und die eluierten Proteine nach elektophoretischer Auftrennung autoradiographisch nachgewiesen.

2.27. Jodierung und Kompetitionstest der monoklonalen Antikörper

0.26 mg mAT 3 in 100 µl NaPP und 200 µCi ^{125}Jod wurden zusammen mit 10 µg Jodogen, mit dem zuvor das Innere des Glasröhrchens beschichtet worden war, 15 Min. bei RT inkubiert und nach der Zugabe von Natriumjodid (Endkonzentration 25 mM) auf einer 5 ml Sephadex G 25 Säule, die mit PBS, 1% FCS äquilibriert worden war, von anderen Reaktionsprodukten getrennt.

0.1 µg GPI-PLC wurden in einer dot-blot Apparatur auf Nitrocellulosepapier übertragen. Nach dem Absättigen aller Bindungsstellen für 15 Min. in PBS, 0.5 mg/ml Tween 20, 1 mg/ml BSA, wurde das Papier 60 Min. bei RT in verdünntem normalem Mausserum, mAT 1, mAT 2, oder polyvalentem anti-GPI-PLC Antiserum gebadet, und nach der Zugabe von jodiertem mAT 3 nochmals 60 Min. bei RT inkubiert. Das Papier wurde fünfmal in PBS, 0.5 mg/ml Tween, 1 mg/ml BSA gewaschen und anschließend die gebundene Radioaktivität bestimmt.

2.28. Immunfluoreszenz

Für die Immunfluoreszenz mit anti-GPI-PLC Antiserum wurden Trypanosomen 10 Min. bei RT in PBS, 4% Formaldehyd fixiert. Für die Immunfluoreszenz mit anti-VSG Antiserum wurden die Zellen mehrere Stunden in 1% Formadehyd fixiert und zweimal in PBS gewaschen. Objektträger wurden für mindestens 30 Min. mit Polylysin (1mg/ml) beschichtet, mit H_2O gewaschen, und nach dem Auftragen von fixierten Trypanosomen 30 Min. in einer feuchten Kammer inkubiert. Nicht gebundene Trypanosomen wurden mit PBS weggewaschen. Die angehefteten Trypanosomen wurden zuerst 30 Min. mit PBS, 10% Schafserum ,dann 60 Min. mit Antiserum verdünnt in PBS, 1% Schafserum inkubiert, und anschließend mit PBS gewaschen. Als zweiter Antikörper wurde beim Einsatz von Mausserum entweder ein FITC-konjugierter Ziege anti-Maus Antikörper oder ein Biotin-konjugierter Schaf anti-Maus Antikörper in Verbindung mit FITC-konjugiertem Streptavidin verwendet. Beim Einsatz von Kaninchenantiserum wurde ein FITC-konjugierter Ziege anti-Kaninchen Antikörper verwendet. Anschließend wurden die Zellen in PBS, 50% Glycerin eingebettet.

Für die Immunfluorescenz mit lebendigen Trypanosomen wurden 5×10^6 Zellen in 500 µl TDB, 10% FCS mit 5 µl Antiserum vermischt und 30 Min. bei 0°C inkubiert. Anschließend wurde nach Zugabe von 500 µl TDB 4 Min. in der Eppendorfzentrifuge zentrifugiert, ein Mal in 1 ml TDB gewaschen und wieder in 500 µl TDB, 10% FCS resuspendiert. Nach Zugabe von 5 µl zweitem FITC konjugiertem Antikörper wurde wieder 30 Min. bei 0°C inkubiert, 500 µl TDB zugegeben, zentrifugiert, ein Mal in 1 ml TDB gewaschen und die Zellen, wie oben beschrieben fixiert, beziehungsweise auch direkt, im Fluoreszenzmikroskop untersucht.

2.29. Polyacrylamidgelelektrophorese und Autoradiographie

Polyacrylamidgelelektrophorese in der Gegenwart von Natriumdodecylsulfat wurde nach Laemmli (200) durchgeführt, wobei die Acrylamidkonzentration im Sammelgel 3% und im Trenngel 10% betrug. Zur Färbung mit Coomassie Blau wurde das Gel mit Methanol:H_2O:Eisessig (5:5:1), 0.5% Coomassie Blau gefärbt und in derselben Lösung ohne Farbstoff entfärbt. Gele wurden mit Silber gefärbt wie beschrieben von Wray et al. (201). Dazu wurde das Gel mindestens eine Stunde in 50% Methanol gewaschen und 15 Min. in Färbelösung inkubiert (Zu einer Mischung von 21 ml 0.36% NaOH und 1.15 ml 25 % Ammoniaklösung p.A. wird unter ständigem Vortexen 4 ml Silbernitratlösung (0.8 g/4 ml) langsam zugetropft). Anschließend wurde das Gel zweimal 5 Min. in destilliertem H_2O gewaschen und dann in Entwickler (2,5 ml 1% Citronensäure + 0,25 ml 38% Formaldehyd + 500 ml H_2O) überführt bis die Proteinbanden sichtbar wurden. Zum Abstoppen der Entwicklung wurde das Gel in 50 % Methanol überführt.

Jodierte Proteine auf getrockneten Gelen wurden durch Autoradiographie bei RT mit einem Dupont Cronex X-ray screen film nachgewiesen. Als Molekulargewichtstandard wurden radioaktiv markierte Proteine von Amersham Buchler, Braunschweig, verwendet. ^{35}S-markierte Proteine wurden durch Fluorographie mit Amplify bei -70°C mit einem Dupont Cronex X-ray screen film nachgewiesen.

2.30. Reinigung von Phosphatidylglycerol aus Escherichia coli

E.coli, Stamm T26P (202) wurde bei 37°C in 20 ml Vogel Bonner Mineralsalz Medium (188), ergänzt mit 0.3% Casein (Difco, vitaminfrei), 0.5% Glycerol, 5 mg/ml Brij 35, 0.001% Ölsäure und 100

µCi (9,10-^{3}H) Ölsäure (5,7 Ci/mmol) bis zum Ende des exponentiellen Wachstums kultiviert. Nach dem Ernten der Zellen wurden die Phospholipide extrahiert, wie von Bligh und Dyer (203) beschrieben. Die Zellen wurden in 450 µl H_2O resuspendiert und nach Zugabe von 1.85 ml Chloroform/Methanol 1:2 (v/v) 30 Minuten bei 0°C inkubiert. Dann wurden nochmals 0.6 ml H_2O und 0.6 ml Chloroform zugegeben, 5 Min. bei 5000 UpM im SS 34 Sorvall Rotor zentrifugiert, und die organische Unterphase abgenommen. Auf einer Kieselgel 60 Dünnschichtchromatographieplatte von Merck (Schichtdicke 0.25) wurden die Lipide mit Chloroform/Methanol/Eisessig (65:25:10) chromatographisch aufgetrennt, das radioaktive Phosphatidylglycerol ausgekratzt, extrahiert mit Chloroform/Methanol (1:2) und unter einem Strom von N_2 eingetrocknet. Nach Resuspension in PBS, 2.5 mM EDTA, 5 mg/ml Triton X-100 wurde es über Nacht gegen den selben Puffer dialysiert.

2.31. Proteinbestimmung

Die Bestimmung des Proteingehalts einer Probe wurde in der von Read und Northcote (204) modifizierten Form des von Bradford (205) beschriebenen Farbstoffbindungstests durchgeführt. Als Standard diente Rinderserumalbumin.

3. Ergebnisse

3.1. Reinigung und Charakterisierung der GPI-PLC

3.1.1. Bestimmung der Aktivität der GPI-PLC

Die Oberfläche von Trypansoma brucei ist im Blut des Säugetierwirtes von einer 12-15 nm dicken Proteinschicht bedeckt, die den Parasiten zum einen gegen lytische Faktoren im Serum schützt, zum anderen durch ständigen Wechsel dieses Oberflächenantigens vor der Immunantwort des Wirts. Der Oberflächenmantel besteht aus ungefähr 10^7 VSG-Molekülen, die die Plasmamembran als monomolekulare Schicht bedecken. Werden Trypanosomen in der Gegenwart von (^{3}H)Myristinsäure inkubiert, so wird diese in VSG eingebaut (124). Lysiert man die Zellen anschließend, wird das radioaktiv markierte mfVSG schnell in unmarkiertes sVSG und 1.2-Dimyristoylglycerin umgewandelt (111,122,125).

Die Unterschiede von mfVSG und sVSG erlauben es die Aktivität der GPI-PLC auf zwei verschiedene Arten zu messen (111). Zum einen ist im mfVSG die kreuzreagierende Determinante am C-terminalen Ende des VSG verdeckt und wird erst bei der Konversion von mfVSG zu sVSG freigelegt (125). Mit kreuzreagierendem Antikörper läßt sich also nur das Produkt der Reaktion, sVSG, immunpräzipitieren, nicht aber das Substrat mfVSG. Da sich die Reaktion durch Zugabe von p-CMBS, einen Inhibitor der GPI-PLC (111), rasch hemmen läßt, kann das Reaktionprodukt, sVSG, durch Immunpräzipitation quantifiziert werden.

mfVSG und sVSG unterscheiden sich in einem 1,2-Dimyristoylglycerin Rest (122), der bei der Konversion abgespalten wird (Abb.8). Daher kann man den Verlauf der Reaktion auch durch Quantifizierung des zweiten Reaktionsprodukts, des Diglycerids,

verfolgen. mfVSG wurde mit (^{3}H)Myristinsäure radioaktiv markiert und über eine anti-VSG Affinitätssäule gereinigt. Inkubierte man gereinigtes (^{3}H)Myristoyl-mfVSG mit einem Detergenslysat von Trypanosomen, wurde die radioaktive Markierung vom mfVSG abgespalten. Sie konnte mit Hexan:Isopropanol (3:2) extrahiert werden, wobei die Menge der abgespaltenen Radioaktivität von der zugegebenen Lysatmenge abhängig war (Abbildung 10). Bei längerer Inkubation von (^{3}H)Myristoyl-mfVSG mit einem Detergenslysat von Trypanosomen entstand freie Myristinsäure, bei Inkubation mit teilweise gereinigter GPI-PLC nur 1.2-Dimyristoylglycerin (122).

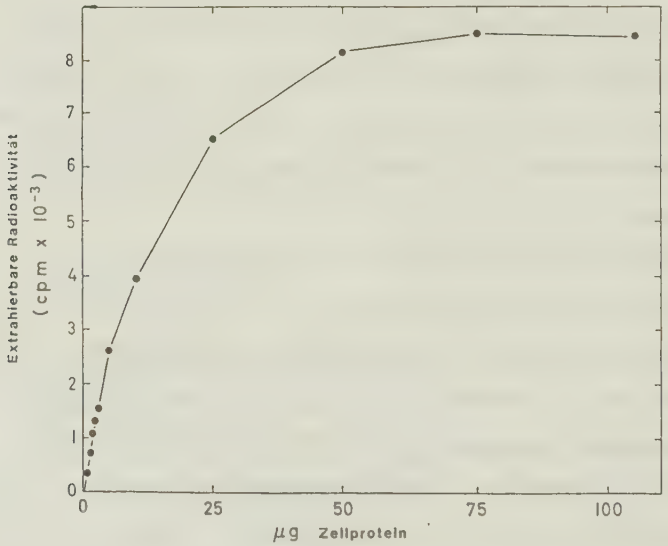


Abbildung 10: Konversion von (^{3}H)Myristoyl-mfVSG bei Inkubation mit einem Trypanosomenlysat.
0.3 µg gereinigtes (^{3}H)mfVSG (10 600 cpm) wurde mit unterschiedlichen Mengen eines Detergenslysats von Trypanosomen in 200 µl 50 mM HEPES, 2.5 mM EDTA, pH 7.0, 0.5 mM DTT, 10 mg/ml Decylpolyoxyethylenether 30 Min. bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 50 µl 20% Essigsäure gestoppt und die abgespaltene Radioaktivität mit 500 µl Hexan:Isopropanol (3:2) extrahiert. Die Radioaktivität in 200 µl der organischen Phase wurde gemessen und gegen die eingesetzte Proteinmenge aufgetragen.

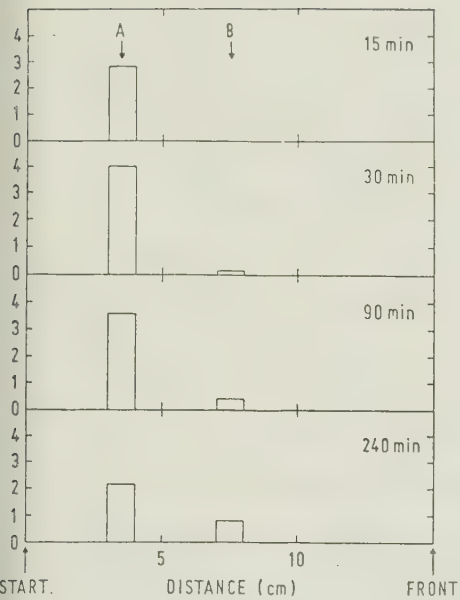
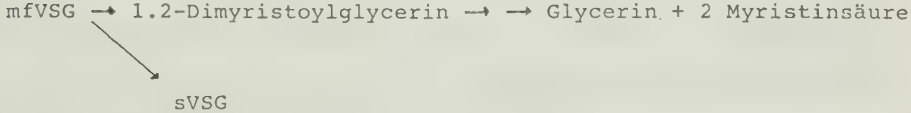


Abbildung 11: Analyse der Reaktionsprodukte nach Inkubation von (^{3}H)Myristoyl-mfVSG mit einem Detergenslysat von Trypanosomen.
0.3 µg gereinigtes (^{3}H)mfVSG (10 600 cpm) wurden mit einem Detergenslysat von Trypanosomen (100 µg Protein) in 200 µl 50 mM HEPES, 2.5 mM EDTA, pH 7.0, 0.5 mM DTT, 10 mg-Decylpolyoxyethylenether inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde die Reaktion durch die Zugabe von 50 µl 20% Essigsäure gestoppt, das abgespaltene 1.2-Dimyristoylglycerin, beziehungsweise die Myristinsäure, mit Hexan:Isopropanol (3:2) extrahiert und 100 µl der organischen Phase auf eine Kieselgeldünnschichtchromatographieplatte aufgetragen. Als Laufmittel wurde Petrolether:Diethylether: Essigsäure (10:30:2) verwendet. Anschließend wurden von der Platte 1 cm breite Streifen ausgekratzt und die Radioaktivität im Szintillationszähler bestimmt. Die Pfeile A und B zeigen die Position der verwendeten Standards: 1.2-Dimyristoylglycerin, beziehungsweise Myristinsäure.

Wie in Abbildung 11 zu sehen ist, wurde 1.2-Dimyristoylgylcerin viel schneller abgespalten als Myristinsäure. Unter Bedingungen, bei denen bereits alles mfVSG zu sVSG umgewandelt war, ließ sich kaum freie Myristinsäure nachweisen. Dies läßt darauf schließen, daß Trypanosomen zum einen ein Phospholipase C-ähnliches Enzym enthalten, das mfVSG in sVSG und 1.2-Dimyristoylglycerin umwandelt, zum anderen eine oder mehrere Lipasen, die 1.2-Dimyristoylglycerin zu Glycerin und Myristinsäure hydrolysieren. Die Reaktion läuft also folgendermaßen ab:



Daher kann auch mit diesem Testansatz die Aktivität der GPI-PLC in einem Trypanosomenlysat bestimmt werden.

Bei einigen Transformationsexperimenten wurde die Aktivität der GPI-PLC durch Immunpräzipitation von sVSG bestimmt, alle anderen im Zusammenhang mit dieser Arbeit durchgeführten Aktivitätsmessungen wurden durch Quantifizierung des abgespaltenen (^{3}H)Dimyristoylglycerin vorgenommen. Dabei wurde bei einer Substratkonzentration von 100 nM in einem Zellysat eine Aktivität von 60 pmol $min^{-1}mg^{-1}$ gemessen. Da die GPI-PLC bei dieser Substratkonzentration nicht mit Substrat gesättigt ist (siehe unten), ist die tatsächliche Aktivität in einem Zellysat viel höher. Trotzdem konnte auch bei Substratkonzentrationen von 30-100 nM die Aktivität verschiedener Fraktionen miteinander verglichen werden, da die Anfangsrate der Konversion von mfVSG zu sVSG linear war (Abbildung 10).

3.1.2. Teilweise Reinigung der GPI-PLC

Die GPI-PLC ist ein membranassoziiertes Protein und kann mit nichtionischen und zwitterionischen Detergentien solubilisiert werden. Zwitterionische Detergentien, wie CHAPS oder Zwittergent 3-12, inhibieren die Konversion von mfVSG zu sVSG ohne die GPI-PLC irreversibel zu inaktivieren.

Um die GPI-PLC zu reinigen, wurden Trypanosomen lysiert und zunächst die löslichen Proteine und die membrangebundenen Bestandteile durch Zentrifugation getrennt. Anschließend wurde der Niederschlag in Triton X-100-haltigem Puffer aufgenommen und die nicht solubilisierten Proteine durch nochmaliges Zentrifugieren entfernt. Die Proteine in einem solchen Detergensextrakt wurden durch Isoelektrofokusierung auf einer 110 ml LKB-Säule aufge-

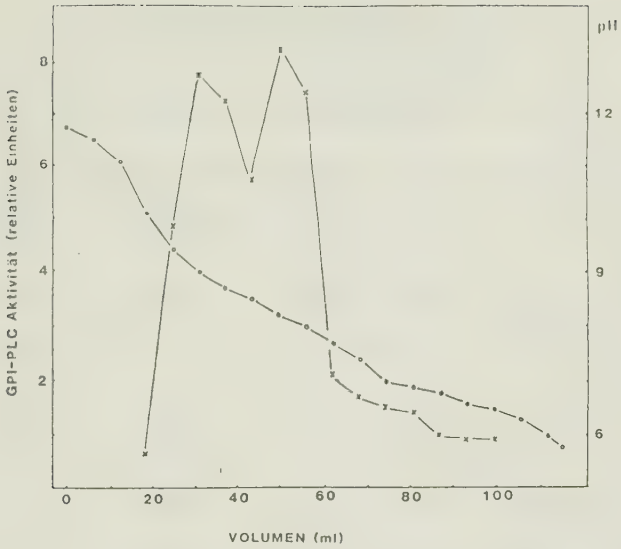


Abbildung 12: Elutionsprofil der GPI-PLC nach Isoelektrofokusierung in einer 110 ml LKB-Säule
Die Proteine in einem Detergensextrakt von Trypanosomenmembranen wurden bei 10°C 60 h bei 2000 V (maximal) und 15 W (konstant) fokusiert. Anschließend wurde die Säule unten geöffnet und der pH (o-o) und die GPI-PLC Aktivität (x-x) der einzelnen Fraktionen bestimmt.

trennt. Dabei fokusierte die GPI-PLC bei pH 8.3 und pH 9.2 (Abb. 12). Daher sollte das Enzym bei pH Werten unterhalb von 8.0 positiv geladen sein und an einen negativ geladenen Ionenaustauscher binden. Nach der Isoelektrofokusierung wurden GPI-PLC haltige Fraktionen deshalb zunächst auf einer Affi-Gel 501 Säule, Agarose, an die eine organische Quecksilberverbindung gekoppelt ist, von den Ampholinen und Proteinen ohne reaktive SH-Gruppe getrennt und dann auf eine CM-Cellulose Säule aufgetragen. Nach der Elution der gebundenen Proteine mit einem 0-0.5 M NaCl Gradienten befand sich das Enzym in den Fraktionen mit 0.05 - 0.25 M NaCl. Auf diese Art und Weise konnte die GPI-PLC ungefähr 1000-fach angereichert werden (Tabelle 4).

Tabelle 4: Reinigung der GPI-PLC

Fraktion	Volumen	Protein	Aktivität	Spezifische Aktivität	Gesamt aktivit
	ml	mg	pmol / mlxmin	pmol / mgxmin	nmol / min
Zellysat von $1.3x10^{11}$ Trypanosomen	130	520	285	60	37
Überstand des Zellysats	390	316	5	6	2
Detergensextrakt	42	110	765	290	32
Unlösliche Fraktion	11	88	142	18	2
Eluat der Isoelektrofokusierungssäule	57	n.d.	425	n.d.	23
Eluat der Affi-Gel 501 Säule	43	0.85	290	14500	12
Eluat der CM-Cellulose Säule	5.5	0.13	1560	66000	9

3.1.3. Isolierung und Charakterisierung von monoklonalen anti-GPI-PLC Antikörpern

Da weitere Versuche die GPI-PLC mit elektrophoretischen und chromatographischen Methoden zu reinigen keinen Erfolg hatten, wurde der Versuch unternommen monoklonale Antikörper gegen die GPI-PLC zu isolieren. Dazu wurde die Milz von Balb/c Mäusen, die mit der 1000-fach gereinigten GPI-PLC immunisiert worden waren, mit NS-1 Myelomzellen fusioniert. Nach einer Fusion konnten 3 Klone mAT 1, mAT 2, mAT 3 , die spezifische Antikörper gegen die GPI-PLC produzieren, isoliert werden. Voraussetzung für die Isolierung dieser Klone war die Entwicklung eines Tests, mit dem

Tabelle 5: Kompetitive Inhibition der Bindung von mAT 3 an die GPI-PLC

Antikörper bzw. Antiserum	Verdünnung	Bindung von mAT 3 an die GPI-PLC
NMS	-	100%
anti-GPI-PLC	1:10	2.5%
anti-GPI-PLC	1:20	37%
anti-GPI-PLC	1:40	56%
anti-GPI-PLC	1:80	130%
mAT 1	-	13%
mAT 2	-	117%
mAT 3	-	0%

0.1 µg GPI-PLC wurden auf Nitrocellulose übertragen, die Bindestellen mit PBS, 0.5 mg/ml Tween 20, 1 mg/ml BSA abgesättigt und mit normalem Mausserum, polyvalentem anti-GPI-PLC Antiserum, oder mAT 1, mAT 2, mAT 3 60 Min. bei RT inkubiert. Nach Zugabe von jodiertem mAT 3 wurde nochmals 60 Min. bei RT inkubiert, das Papier gewaschen und die gebundene Radioaktivität bestimmt.

anti-GPI-PLC Antikörper nachgewiesen werden konnten. Da keine gereinigte GPI-PLC zur Verfügung stand, noch das Molekulargewicht bekannt war, wurden die anti-GPI-PLC Antikörper anhand ihrer Fähigkeit, die GPI-PLC Aktivität in Verbindung mit S.aureus Zellen aus einem Detergensextrakt von Trypanosoemenmembranen zu präzipitieren, identifiziert. In 20 µl Überstand, der in diesem Test positiven Klone, befanden sich genug Antikörper um 60% der eingesetzten GPI-PLC Aktivität (= 4×10^5 Trypanosomen) zu präzipitieren. Wurden aus Ascitesflüssigkeit gereinigte Antikörper in höherer Konzentration eingesetzt, konnte mit jedem der 3 monoklonalen Antikörper die gesamte GPI-PLC Aktivität in einem Trypanosomenlysat präzipitiert werden. Die GPI-PLC ist also das einzige Enzym in einem Trypanosomenlysat, das mfVSG zu sVSG umwandelt. Keiner der monoklonalen Antikörper inhibierte die

Konversion von mfVSG zu sVSG. Alle drei Antikörper wurden weder durch hohen pH (> 11.5), noch durch niedrigen pH (< 3) oder hohe Ionenstärke (3M $MgCl_2$) irreversibel inaktiviert.

Um herauszufinden, ob die drei unabhängig voneinander isolierten Hybridomazellinien Antikörper produzieren, die unterschiedliche Epitope erkennen, wurde der monoklonale Antikörper mAT 3 gereinigt und jodiert. Gereinigte GPI-PLC wurde mit einer dot-blot Apparatur auf Nitrocellulose aufgetragen und in Gegenwart von mAT 1, mAT 2, oder polyvalentem anti-GPI-PLC Antiserum mit dem jodierten mAT 3 inkubiert. Nur polyvalentes anti-GPI-PLC Antiserum und mAT 1 konnten die Bindung von jodiertem mAT 3 an die GPI-PLC verhindern (Tabelle 5).

mAT 2 und mAT 3 binden also an unterschiedliche Epitope, während die Bindung von mAT 1 die Bindung von mAT 3 verhindert.

3.1.4. Reinigung der GPI-PLC mit mAT 3

Für die Reinigung der GPI-PLC wurden gereinigte monoklonale Antikörper an Reacti-Gel gekoppelt. Nach dem Auftragen eines Detergensextraktes aus Trypanosomenmembranen auf eine solche Säule konnte die gebundene GPI-PLC weder bei niedrigen pH Werten, noch mit hoher Ionenstärke in einer aktiven Form eluiert werden, wohl aber mit 50 mM Na-phosphat pH 12.0 unter sehr definierten Bedingungen. Auf diese Art und Weise konnte die GPI-PLC ungefähr 3500-fach gereinigt werden. Die höchste Ausbeute, ungefähr 30%, wurde mit dem monoklonalen Antikörper mAT 3 erzielt (Tabelle 6).

Tabelle 6: Reinigung der GPI-PLC mit mAT 3

Fraktion	Volumen	Protein	Aktivität	Spezifische Aktivität	Gesamt-aktivität
	ml	mg	$\frac{pmol}{ml \times min}$	$\frac{pmol}{mg \times min}$	$\frac{nmol}{min}$
Zellysat von 1.4×10^{11} Trypanosomen	140	700	310	60	43
Überstand des Zellysats	380	460	6	4	2
Detergensextrakt	70	84	420	360	30
Durchlauf und Waschlösungen der mAT 3 Säule	93	65	8	15	1
Eluat der mAT 3 Säule	7	0.076	2000	184000	14

3.1.5. Bestimmung des Molekulargewichts

Die GPI-PLC wanderte während der Polyacrylamidgelelektrophorese in der Gegenwart von Natriumdodecylsulfat mit einem apparenten Molekulargewicht M_r=39 000 (Abb. 13). Aufgrund der angewandten Elutionsbedingungen wurde das Protein aber manchmal zum Teil verändert, sodaß es sich wie ein Protein mit dem Molekulargewicht M_r=42 000 verhielt. Wie in Abb. 13 zu sehen hat an die monoklonale Antikörper Affinitätssäule ein Protein mit dem Molekulargewicht M_r=39 000 gebunden (Abb.13, Bahn 1). Durch Kochen des Säulenmaterials in Natriumdodecylsulfat vor der Elution des gebundenen Proteins mit NaPP, pH 12.0, wurde ein Protein mit dem Molekulargewicht M_r=39 000 und die Proteine der monoklonalen Antikörperpräparation, die an das Säulenmaterial gekoppelt wurden, eluiert (schwere und leichte Kette des monoklonalen Antikörpers und etwas Sereumalbumin; 56 k,28.5 k,60 k).

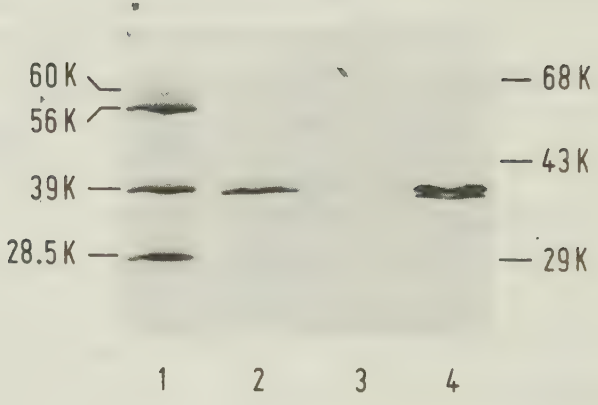


Abbildung 13: Gelelektrophorese der gereinigten GPI-PLC. Bahn 1 zeigt die Auftrennung der Proteine, die an die anti-mfVSG-Hydrolase monoklonale Antikörpersäule gebunden haben und durch Kochen des Affinitätsharzes in Natriumdodecylsulfat abgelöst wurden; Bahn 2 die GPI-PLC direkt nach der Elution von der Affinitätssäule; Bahn 3 und 4 die eluierte GPI-PLC nach einer anderen Reinigung. Das Enzym wurde bei -20°C eingefroren und nach 12 h auf das Gel aufgetragen. Bahn 4 zeigt dasselbe Gel wie Bahn 3, aber nach zusätzlicher Färbung mit Silber.

Protein mit M_r=39 000 entspricht der GPI-PLC. Kurz nach der Elution des Enzyms mit NaPP, pH 12.0 hatte sich nur ein geringer Teil in das 42 k Protein umgewandelt. Während der Lagerung des eluierten Proteins bei -20°C wandelte sich ungefähr 50% des 39 k Protein in das 42 k Protein um. Das Mengenverhältnis der beiden Proteinspecies blieb später unverändert, auch wenn die Proteine ein zweites Mal bei pH 12.0 inkubiert wurden. Da beide Proteine auch nach vollständiger Inaktivierung der GPI-PLC bei pH 12.0 noch vorhanden wäre, kann das Auftauchen des 42 k Proteins nicht ausschließlich durch Denaturierung der GPI-PLC erklärt werden. Bahn 3 und 4 zeigen das Ergebnis einer unabhängigen Reinigung. Nach Coomassie Blue Färbung des Gels war nur ein Doublett um 40 k zu sehen, die sensitivere Färbung mit Silber zeigte außerdem

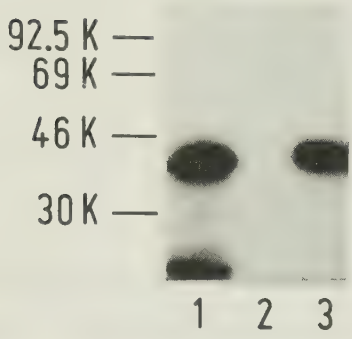


Abbildung 14: Immunpräzipitation der gereinigten GPI-PLC. Die gereinigte GPI-PLC wurde jodiert (Bahn 1) und mit normalem Mausserum (Bahn 2) oder mit dem monoklonalen Antikörper mAT 1 (Bahn 3) immunpräzipitiert. Das Bild zeigt ein Autoradiogramm nach Gelelektrophorese.

mehrere geringfügige Verunreinigungen.

Um nachzuweisen, daß das 39 k Protein und keine der Verunreinigungen der GPI-PLC entspricht, wurde die gereinigte Enzympräparation jodiert und mit normalem Mausserum oder anti-GPI-PLC monoklonalem Antikörper und S.aureus immunpräzipitiert. Unter Bedingungen unter denen mit dem monoklonalen Antikörper mAT 1 die gesamte GPI-PLC Aktivität präzipitiert werden kann, wurde mit normalem Mausserum kein Protein präzipitiert, mit mAT 1 aber das 39 k Protein (Abb. 14). Daher ist die Aktivität der GPI-PLC mit dem 39 k Protein assoziiert.

3.1.6. Substratabhängigkeit und Substratspezifität

Um die maximale Aktivität der gereinigten GPI-PLC zu bestimmen, wurde die Aktivität des Enzyms in Abhängigkeit von der mfVSG Konzentration bestimmt (Abb. 15). Bei einer Substratkonzentration

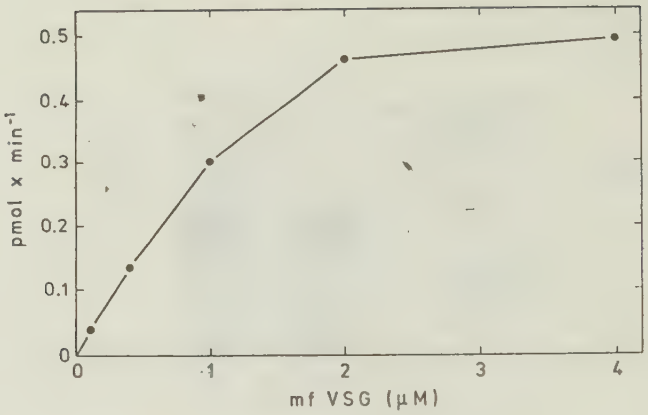


Abbildung 15: Substratabhängigkeit der GPI-PLC.
250 pg gereinigte GPI-PLC wurden mit unterschiedlichen Mengen (^{3}H)Myristoyl-mfVSG in 200 µl 50 mM HEPES, 2.5 mM EDTA, pH 7.0, 0.5 mM DTT, 1 mg/ml Triton X-100 30 Min. bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 50 µl 20% Essigsäure gestoppt und die abgespaltene Radioaktivität mit 500 µl Hexan:Isopropanol (3:2) extrahiert. Die Radioaktivität in 200 µl der organischen Phase wurde gezählt und die Menge an umgesetzten mfVSG berechnet.

von 4 µM wurde bei Raumtemperatur eine Aktivität von 2 µMol mfVSG min^{-1} mg^{-1} gemessen.

Das mfVSG ist wahrscheinlich durch den Phosphatidylinositolrest in der Membran verankert. Dieser Phosphatidylinositolrest wird analog der von einer Phospholipase C katalysierten Reaktion durch die GPI-PLC gespalten (122). Die Substratspezifität der GPI-PLC wurde untersucht, indem das gereinigte Enzym mit Phosphatidylglycerol, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylcholin und Phosphatidylinositol 12 h bei RT in PBS, 2.5 mM EDTA, 5 mg/ml Triton X-100 inkubiert wurde. Obwohl die Aktivität des Enzyms während dieses Zeitraums erhalten blieb, wurden nur mfVSG und Phosphatidylinositol gespalten, nicht jedoch Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylcholin oder Phospatidylglycerin. Bei der verwendeten Substratkonzentration (175 nM) wurde Phospha-

tidylinositol 170-mal langsamer gespalten als mfVSG (230 nmol $min^{-1}mg^{-1}$ bzw. 1.4 nmol $min^{-1}mg^{-1}$). Die GPI-PLC ist daher sehr spezifisch für mfVSG.

3.1.7. Wechselwirkung mit Lectinen

Die GPI-PLC bindet nicht an Sepharose gekoppeltes Concanavalin A, Helix pometia Agglutinin, Weizenkeimagglutinin, und Ricinus communis Agglutinin. Sie enthält daher wahrscheinlich keine exponierten Mannose-, N-Acetylgalactosamin-, N-Acetylglucosamin- oder Galactosereste und ist somit vermutlich kein Glykoprotein.

3.1.8. pH Optimum, Temperaturoptimum, Stabilität

Die GPI-PLC zeigte ihre größte Aktivität bei pH Werten um 8.5. Unterhalb pH 5 und oberhalb pH 11.5 oder durch 2 M $MgCl_2$ und 1 M NaSCN wurde das Enzym inaktiviert. Zn^{++} und Hg^{++} inhibierten die Reaktion, auch in der Gegenwart von Dithiothreitol. Mg^{++}, Ca^{++}, EDTA oder EGTA (10 mM) hatten keinen Effekt auf die Aktivität. Das Temperaturoptimum der Reaktion lag bei 37°C, oberhalb von 40°C wurde das Enzym inaktiviert. In einem Detergensextrakt aus gewaschenen Membranen war die GPI-PLC für mehrere Stunden stabil, bei -20°C für mehrere Wochen.

3.1.9. Rekonstitution von mfVSG und GPI-PLC in Phospholipidvesikel

Die Konversion von mfVSG zu sVSG kann offensichtlich durch die GPI-PLC katalysiert werden, wenn sich Enzym und Substrat, zumindest vor dem Mischen der Komponenten, in unterschiedlichen Deter-

gensmizellen befinden. Interessanterweise fand die Reaktion nicht statt, wenn Enzym und Substrat an verschiedene Phospholipidvesikel gebunden sind. mfVSG und GPI-PLC wurden getrennt in Liposomen aus E.coli Phospholipid (85% Phosphatidylethanolamin, 5-15%, Phosphatidylglycerol, 5-15% Phosphatidylcholin) rekonstituiert. Nach dem Mischen solcher Proteoliposomen wurde das mfVSG mit einer Geschwindigkeit von o.2 nmol min^{-1} mg^{-1} in sVSG umgesetzt. Nach Zugabe von 10 mg/ml Triton X-100 erhöhte sich die Rate auf 100 nmol min^{-1} mg^{-1}. Auch nach der Fusion von mfVSG-haltigen und GPI-PLC haltigen Vesikeln durch zweimaliges Einfrieren und Auftauen (206) wurde mfVSG zu sVSG umgewandelt. Unter den angewandten Bedingungen war die Reaktion in Proteoliposomen schneller als in Gegenwart von 10 mg/ml Triton X-100 (200 nmol $min^{-1}mg^{-1}$ beziehungsweise 100 nmol min^{-1} mg^{-1}).

Diese Versuchsergebnisse zeigen, daß die GPI-PLC die Phosphodiesterbindung des mfVSG nur dann spalten kann, wenn sich beide Moleküle in der selben Phospholipiddoppelschicht befinden.

3.1.10. Präparation und Charakterisierung von polyvalenten anti-GPI-PLC Antikörpern

Für die Herstellung von anti-GPI-PLC Antiserum wurden Balb/c Mäuse mit der auf der monoklonalen Antikörper-Affintätssäule gereingten GPI-PLC immunisiert. Die Spezifität des Serums wurde durch Immunpräzipitation jodierter Proteine in einem Detergensextrakt aus Trypanosomenmembranen untersucht. Bei Verwendung von S.aureus Zellen wurde sowohl mit Immun- wie mit Nicht-Immunserum sehr viel Radioaktivität unspezifisch präzipitiert. Deshalb wurden Antigen-Antikörper Komplexe an eine Protein A Sepharose-

säule absorbiert und die Säule anschließend solange gewaschen, bis keine Radioaktivität mehr eluiert wurde. Gebundene Proteine wurden durch Kochen des Säulenmaterials in 4% Natriumdodecylsulfat eluiert, elektrophoretisch aufgetrennt, und autoradiographisch nachgewiesen. Wie aus Abb. 16 hervorgeht, wurden mit normalem Mausserum geringe Mengen verschiedener Proteine präzipitiert, mit anti-GPI-PLC Antiserum außerdem das für die GPI-PLC typische 39 k Protein. Das 42 k Protein, das im Eluat der monoklonalen Antikörper Affinitätssäule vorhanden war, ließ sich nicht nachweisen. Dies bestätigt, daß das Auftauchen des 42 k Proteins ein Artefakt der angewandten Elutionsbedingungen ist und normalerweise in Trypanosomen nicht vorkommt.

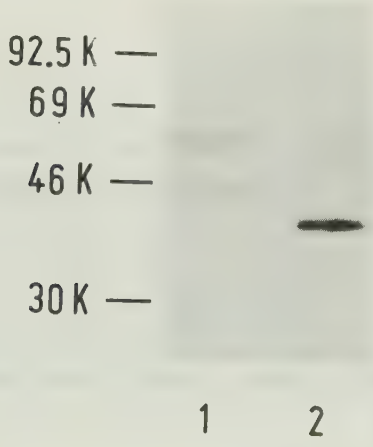


Abbildung 16: Charakterisierung von anti-GPI-PLC Antiserum. 5 µg Protein in einem Detergensextrakt von Trypanosomen wurden jodiert, mit normalem Mausserum (Bahn 1) oder anti-GPI-PLC Antiserum (Bahn 2) inkubiert, und auf eine 100 µl Protein A Sepharose Säule aufgetragen. Gebundenes Protein wurde durch Kochen des Harzes in Natriumdodecylsulfat abgelöst und elektrophoretisch aufgetrennt. Das Bild zeigt ein Autoradiogramm des Gels.

3.2. Lokalisation der GPI-PLC in der Zelle

3.2.1. Trypsinverdau der GPI-PLC

Wie die Versuche mit Proteoliposomen gezeigt haben, kann die GPI-PLC die Phosphodiesterbindung des mfVSG nur dann spalten, wenn sich sowohl das Enzym als auch das Substrat in der selben Phospholipiddoppelschicht befinden. Da die Blutformzellen ständig bemantelt sind, kann sich die GPI-PLC daher nicht in der Plasmamembran befinden, es sei denn, sie wäre in falscher Orientierung in die Plasmamembran eingebettet, oder sie befände sich in einem inaktiven Zustand.

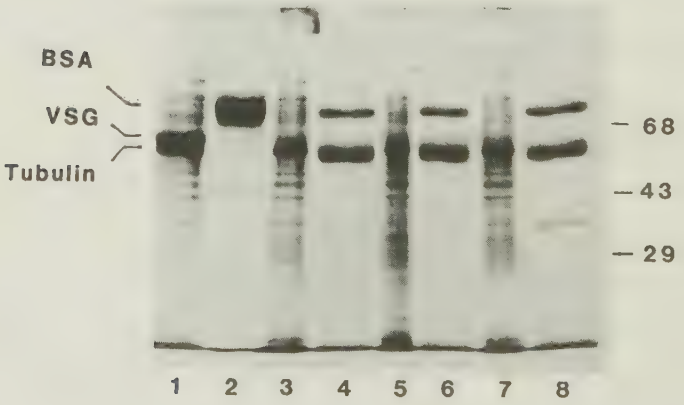


Abbildung 17: Proteolytische Spaltung des VSG durch Trypsinbehandlung von Trypanosomen.
MiTat 1.2 Trypanosomen wurden mit Trypsin behandelt. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde die Reaktion gestoppt, Zellen und Medium durch Zentrifugation getrennt und Zellysat und Medium elektrophoretisch aufgetrennt. Bahn 1,3,5,7 - Zellysat nach 0,5,15,30 Min. Inkubation; Bahn 2,4,6,8 - Medium.

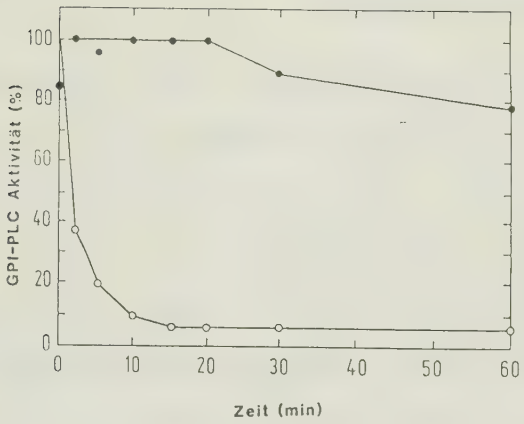


Abbildung 18: Trypsinbehandlung von Trypanosomen vor und nach Zellyse.
MiTat 1.2 Trypanosomen wurden vor (●-●) oder nach (○-○) Zellyse mit Trypsin behandelt. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde die Aktivität der GPI-PLC bestimmt.

Um herauszufinden, ob die GPI-PLC von der Zellaussenseite zugänglich ist, wurden intakte Trypanosomen der Variante MiTat 1.2 mit Trypsin behandelt. Bei dieser Behandlung wurde innerhalb weniger Minuten das VSG an der Oberfläche der Trypanosomen proteolytisch gespalten (Abb. 17). Nach längerer Inkubationszeit rundeten sich die Zellen ab, wobei das Flagellum noch schwache Bewegungen zeigte. Schließlich lysierten die Zellen.

Solange die Zellen nicht lysierten, wurde die Aktivität der GPI-PLC durch eine solche Trypsinbehandlung nicht vermindert (Abb. 18). Lysierte man die Zellen vor der Trypsinbehandlung, sank die Aktivität der GPI-PLC unter den angewandten Bedingungen innerhalb von 10 Min. auf 10% der Ausgangsaktivität. Diese Versuchsergebnisse machen es sehr unwahrscheinlich, daß die GPI-PLC an der Zelloberfläche exponiert ist.

3.2.2. Saccharosedichtegradientenzentrifugation von Trypanosomenmembranen

Zellfraktionierungsexperimente, die in Zusammenarbeit mit Dr. Fred Opperdoes in Brüssel durchgeführt wurden, zeigten, daß sich die Verteilung der GPI-PLC in einem Saccharosedichtgradienten von der typischer Plasmamembranenzyme wie α-D-glukosidase und 3'-nukleotidase unterscheidet (Abb. 19)(193).

Wie Opperdoes und Steiger (207) zeigen konnten, veränderte sich die Dichte der die α-D-Glukosidase enthaltenden Membranen von 1.22 auf 1.17 g/cm³, wenn als Homogenisierungspuffer 1 mM Imidazol an Stelle von 25 mM Tris-HCl verwendet wurde (Abb. 20, Teil 1 und 2). Dies ist wahrscheinlich auf eine Ablösung der unter der Plasmamembran liegenden Mikrotubuli zurückzuführen (193). Die Verteilung der Aktivität von Enzymen, die nicht in der Plasmamembran lokalisiert sind, änderte sich unter diesen Bedingungen nicht. In Abbildung 20 sind zum Vergleich die Verteilung der Aktivität der sauren Phosphatase (Teil 3 und 4), die in der Flagellartasche lokalisiert sein soll (193), der α-D-Glukosidase (1 und 2) und der GPI-PLC gezeigt (5 und 6). Während die Verteilung der α-D-Glukosidase von den Aufschlußbedingungen abhing, waren die der GPI-PLC und der sauren Phosphatase invariant. Letzteres gilt auch für die Alaninaminotransferase (Cytosol, 208), die Hexokinase (Glykosomen, 208), die Mannosidase (Lysosomen, 193) und die Isocitratdehydrogenase (Mitochondrien, 208).

Die Verteilung der GPI-PLC Aktivität stimmt mit keiner Verteilung anderer Markerenzyme genau überein. Daher geben diese Versuchsergebnisse keinen Hinweis darauf, wo die GPI-PLC lokalisiert ist, sie deuten aber darauf hin, daß sie sich nicht in der Plasmamembran befindet.

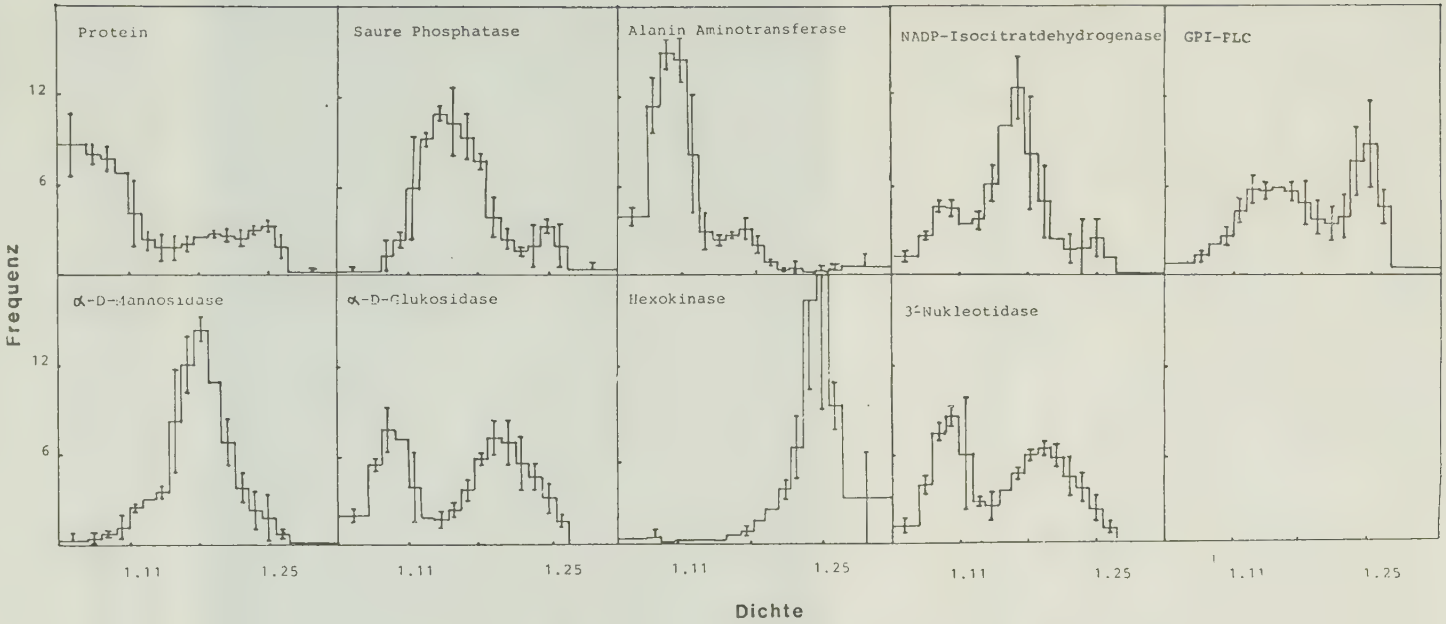


Abbildung 19: Verteilung der Aktivität verschiedener Enzyme nach Saccharosedichtegradienten-zentrifugation von Trypanosomenmembranen. Als Homogenisierungspuffer wurde 1 mM Imidazol verwendet. Das Bild zeigt das Ergebnis zweier unabhängiger Experimente (Mittelwert ± Standartabweichung).

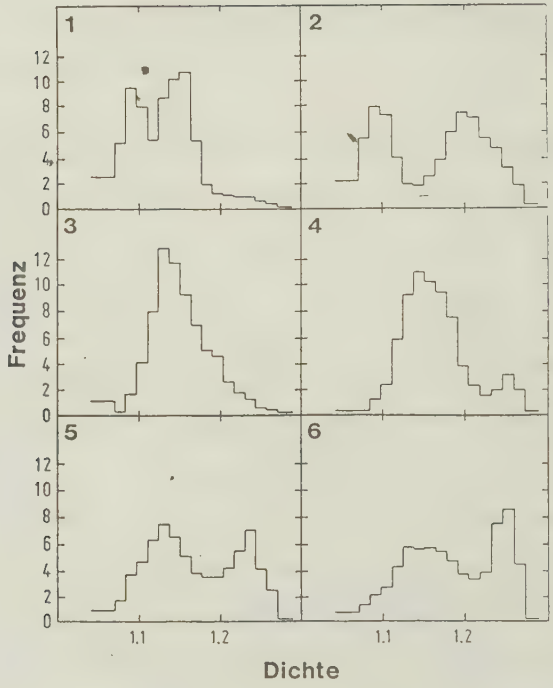


Abbildung 20: Verteilung der Aktivität der -D-Glukosidase (1 und 2), der sauren Phosphatase (3 und 4), und der GPI-PLC (5 und 6) nach Saccharosedichtegradientenzentrifugation von Trypanosomenmembranen. Als Homogenisierungspuffer wurde 25 mM Tris-HCl (1,3,5) oder 1 mM Imidazol (2,4,6) verwendet.

3.2.3. Immunfluoreszenz

Durch die Behandlung von schwach fixierten Trypanosomen mit dem monoklonalen Antikörper mAT 3 und dem Biotin-Streptavidin-FITC System wurde nicht die Plasmamembran einheitlich markiert, sondern die Zellen erschienen gepunktet (Abb. 21). Auch diese Ergebnisse sprechen dafür, daß die GPI-PLC nicht in der Plasmamembran, sondern eher in intrazellulären Vesikeln lokalisiert ist. Da die Zellen nur sehr schwach fixiert waren, muß das Ergebnis aber sehr

vorsichtig interpretiert werden. Bei längerer Fixierung mit Formaldehyd oder bei Verwendung von Glutaraldehyd konnte weder mit den monoklonalen Antikörpern noch mit dem polyvalenten anti-GPI-PLC Antiserum ein positives Signal erzielt werden. Auch in lebenden Zellen war eine Markierung des Enzyms mit Antikörpern nicht möglich. Die Antikörper reagieren aber mit der GPI-PLC, wenn sie auf Nitrocellulose übertragen und anschließend mit Fixativ behandelt wurde. Das Enzym wird durch die Fixierung also wahrscheinlich nicht denaturiert, sondern es ist nach starker Fixierung der Zellen für die Antikörper nicht mehr zugänglich. Eine Markierung des Enzyms mit Antikörpern und Protein A - Goldpartikeln in ultradünnen Plastikschnitten war aber auch erfolglos.

Abbildung 21: Lokalisation der GPI-PLC in Blutformzellen nach Fixierung mit 2% Formaldehyd für 10 Min. bei RT. Für die Immunfluoreszenz wurden der monoklonale Antikörper mAT 3 und das Biotin-Streptavidin-System verwendet.

3.3. Untersuchungen zur Funktion der GPI-PLC

Die Funktion der GPI-PLC ist unbekannt. Daher wurde untersucht unter welchen Bedingungen das mfVSG an der Oberfläche des Parasiten in sVSG gespalten wird.

3.3.1. Abspaltung des Oberflächenmantels bei Zellyse

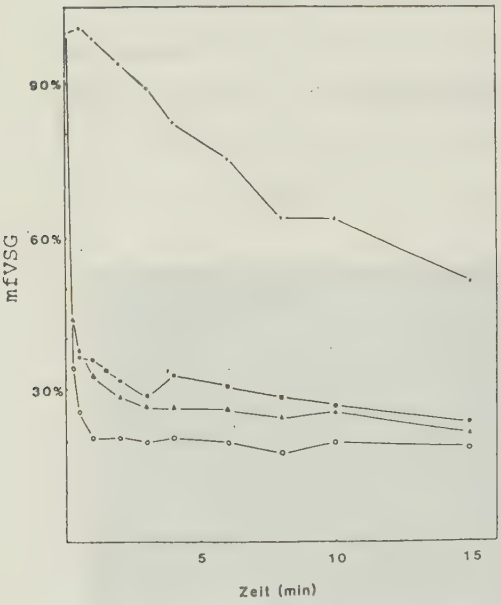


Abbildung 22: Abspaltung des Oberflächenmantels bei Zellyse.
Trypanosomen wurden mit (^{3}H)Myristinsäure radioaktiv markiert und anschließend lysiert: (○-●) in PBS, 0.1 mM TLCK, 10 mg/ml Triton X-100, (○-○) durch Beschallen, (▲-▲) in H_2O, (■-■) durch Stickstoffkavitation. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde die GPI-PLC durch die Zugabe von CHAPS (2.5 mg/ml) und pCMBS (1 mM) inhibiert und das verbliebene (^{3}H)Myristoyl-mfVSG immunpräzipitiert.

Um die Abspaltung des Oberflächenmantels bei Zellyse zu untersuchen, wurden Trypanosomen mit (^{3}H)Myristinsäure markiert und anschließend auf unterschiedliche Art und Weise lysiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde die Spaltung von mfVSG in sVSG durch die Zugabe von Zwittergent 3-12 und pCMBS gehemmt, und das verbliebene (^{3}H)Myristoyl-mfVSG wurde durch Immunpräzipitation quantifiziert. Die Ergebnisse eines solchen Experiments sind in Abb. 22 zu sehen. Bei Zellyse wurden ungefähr 80% des (^{3}H)Myristoyl-mfVSG gespalten, wobei die Konversion bei Lyse in detergenshaltigem Puffer langsamer war als bei Lyse durch Beschallen, in destilliertem

Wasser oder durch Stickstoffkavitation. Lysebedingungen, bei denen mfVSG nicht gespalten wurde, konnten nicht gefunden werden. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse, die mit dem Enzym und Substrat nach Rekonstitution in Phopsholipidvesikel gefunden wurden, lassen sich diese Ergebnisse am ehesten so erklären: Wenn mfVSG und GPI-PLC in der Gegenwart von Detergens gemischt werden, wird das mfVSG vollständig in sVSG gespalten (siehe auch Abb. 10). Lysiert man die Zellen ohne die Membranbestandteile zu solubilisieren, befinden sich Enzym und Substrat wahrscheinlich in der selben Phospholipiddoppelschicht und die Reaktion läuft viel schneller ab als in Detergensmicellen. Einige mfVSG-haltige Vesikel enthalten jedoch kein Enzym und das darin befindliche mfVSG wird deshalb nicht gespalten.

3.3.2. Abspaltung des Oberflächenmantels während der in vitro Kultivierung von Trypanosoma brucei

mfVSG wird nicht nur bei Zellyse zu sVSG umgewandelt, sondern auch während der Kultivierung von Blutformzellen von T. brucei. Dieser Vorgang wurde in sieben unabhängigen "pulse-chase" Experimenten untersucht.

Trypanosomen der Variante MiTat 1.4 oder MiTat 1.2 wurden mit (^{35}S)-Methionin radioaktiv markiert und anschließend bei 37°C kultiviert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde die Zellzahl, die Radioaktivität und die VSG-Menge in den Zellen und im Medium bestimmt. Die Ergebnisse eines typischen Experiments zeigt Abbildung 23.

Bei der radioaktiven Markierung der Trypanosomen unter den beschriebenen Bedingungen wurden 1.5 ± 0.1 cpm pro Zelle eingebaut. Über 95% der zellgebunderen Radioaktivität konnte mit 10% TCA

gefällt werden. 19% ± 2% der detergenslöslichen Radioaktivität konnte mit anti-VSG Antiserum immunpräzipitiert werden. Wie in Abbildung 24 zu sehen, wurde ausschließlich VSG immunpräzipitiert.

Während der Kultivierung bei 37°C stieg die Zelldichte in 45 h von 2 x 10^5/ml auf 1-2.5 x 10^6/ml. Während dieses Zeitraumes wurden 71% der zu Anfang zellassoziierten Radioaktivität ins Medium abgegeben. Davon konnten 29% mit 10% TCA gefällt und 13% mit anti-VSG Antiserum immunpräzipitiert werden. Aus den Messwerten der sieben Experimente wurden die Halbwertszeit der zellassoziierten Radioaktivität und des radioaktiven VSGs errechnet (± Standardabweichung des Mittelwertes). Die zellassoziierte Radioaktivität nahm mit einer Halbwertszeit $t_{1/2}$ = 28 h ± 1 h ab, das radioaktive VSG (zellgebundenes VSG + VSG im Medium) mit einer Halbwertszeit $t_{1/2}$ = 189 h ± 24 h. Dabei konnten keine Unterschiede gefunden werden, wenn die Zellen mit oder ohne Fütterzellschicht in Trypanosomenmedium oder Baltz-Medium kultiviert wurden (nur die Variante MiTat 1.2 wurde ohne Fütterzellschicht kultiviert). Das VSG wurde also fast überhaupt nicht metaboli-

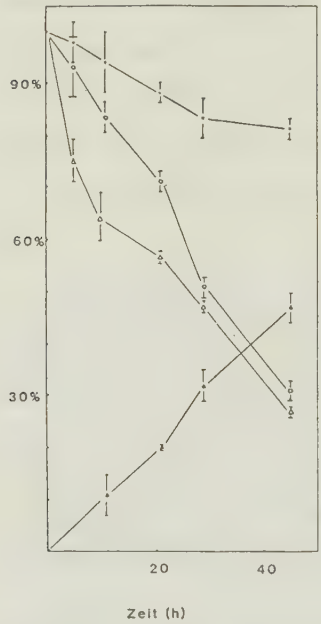


Abbildung 23: Abspaltung des Oberflächenmantels bei der in vitro Kultivierung von MiTat 1.4 Trypanosomen. Trypanosomen wurden mit (^{35}S)-Methionin radioaktiv markiert und über einer Fütterzellschicht bei 37°C kultiviert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde die Radioaktivität in den Zellen (Δ-Δ), das VSG in den Zellen (o-o), das VSG im Medium (▲-▲), und das VSG im Medium und in den Zellen (●-●) quantifiziert. Die Balken geben die Standardabweichung des Mittelwerts an.

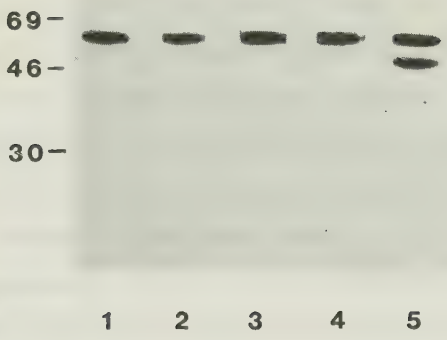


Abbildung 24: Autoradiogramm nach elektrophoretischer Auftrennung von immunpräzipitiertem (^{35}S)VSG.
Trypanosomen wurden mit (^{35}S)-Methionin radioaktiv markiert, für 21 h bei 37°C kultiviert und anschließend bei 37°C ohne CCA (Bahn 1,2), 37°C mit CCA (Bahn 3), 27°C ohne CCA (Bahn 4), und 27°C mit CCA (Bahn 5,6) inkubiert. Nach 27 h wurden Zellen und Medium durch Zentrifugation getrennt und das VSG im Zellysat (Bahn 1 + 6) und im Medium (Bahn 2-5) immunpräzipitiert.

siert, sondern es wurde mit konstanter Geschwindigkeit von den Zellen ins Medium abgegeben. Nur intakte VSG-Moleküle erschienen im Medium (Abb. 24). Da das VSG fast gar nicht abgebaut wurde, kann man auch eine Halbwertszeit für die Abnahme des zellgebundenen radioaktiven VSGs berechnen. Diese Halbwertszeit betrug $t_{1/2}$ = 32 h $\pm$ 3 h, das heißt, 2% des Oberflächenmantels der Blutformzellen wurden pro Stunde abgespalten. Da das abgespaltene VSG durch Neusynthese ständig ersetzt wurde, blieben die Zellen bemantelt.

3.3.3. Abspaltung des Oberflächenmantels während der Transformation von Trypanosoma brucei

Infiziert sich eine Tsetsefliege beim Saugen des Blutes eines mit Trypanosomen befallenen Tieres, so entwickeln sich in ihrem Verdauungstrakt schnell sogenannte procyclische Trypansomen (12-13), deren Plasmamembran nicht wie die der Blutformzellen von einem Oberflächenmantel bedeckt ist (14). Dieser Entwicklungsschritt kann auch in vitro durchgeführt werden, indem man T. brucei in Gegenwart von Citrat und cis-Aconitat (CCA) bei 27°C kultiviert. Unter diesen Bedingungen wird die VSG-Synthese reprimiert, der Oberflächenmantel wird abgespalten und das VSG erscheint im Medium; die Zellen differenzieren zu unbemantelten procyclischen Zellen (94-97,107).

In Abbildung 27 sind die Experimente acht unabhängiger Transformationsexperimente mit der Variante MiTat 1.4 zusammengefaßt. Der obere Teil zeigt die Wachstumskurve der Blutformen bei 37°C (●-●, -17 - 0 h) und der procyclischen Zellen bei 27°C (●-●, 0 - 120 h). Die Abspaltung des Oberflächenmantels während der Transformation wurde auf zwei verschiedene Arten bestimmt. Erstens wurde in acht Experimenten der prozentuale Anteil der bemantelten Zellen bestimmt (Abb. 27., x -x). Bemantelte Zellen verschwanden mit einer Halbwertszeit von $t_{1/2}$ = 14 h. Zweitens wurden in zwei Experimenten Trypanosomen mit (^{35}S)-Methionin radioaktiv markiert und die Halbwertszeit des radioaktiv markierten zellassoziierten VSG gemessen. Die Halbwertszeit ergab sich zu $t_{1/2}$ = 13 h (Tabelle 7; 27°C + CCA). Die Halbwertszeit des gesamten VSG-Pools blieb im Rahmen der Meßgenauigkeit unverändert. Durch das Absenken der Temperatur stieg die Halbwertszeit der zellassoziierten Radioaktivität, also die mittlere Halbwerts-

zeit aller Proteine, von $t_{1/2}$ = 28 ± 3 h auf $t_{1/2}$ = 60 ± 4 h (Tabelle 7, 37°C bzw.27°C).

Die Differenzierung der bemantelten Blutformen zu unbemantelten procyclischen Zellen erfordert zwei Signale, ein Absenken der Temperatur von 37°C auf 27°C, und die Zugabe von CCA zum Medium. Zur Kontrolle wurde untersucht welchen Effekt jedes der beiden Signale hat, wenn es den Zellen alleine gegeben wird. Dazu wurden Trypanosomen mit (^{35}S)-Methionin radioaktiv markiert und 16-20 h bei 37°C kultiviert. Anschließend wurden die Zellen entweder nach Zugabe von CCA weiterhin bei 37°C oder bei 27°C ohne CCA inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde die Zellzahl, die Radioaktivität und die VSG-Menge in den Zellen und im Medium bestimmt.

Bei 37°C mit CCA und bei 27°C ohne CCA transformierten die Zellen unvollständig (siehe auch Abschnitt 1.8.), das heißt, nach 48-72 Stunden stellten die Zellen ihr Wachstum ein und fingen an abzusterben. Die beschriebenen Experimente erstreckten sich daher nur auf einen Zeitraum von ungefähr 40 Stunden, die Zellen blieben während dieses Zeitraums bemantelt.

Die Zugabe von CCA hatte keinen Einfluß auf den Gesamtproteinturnover (Tabelle 7). Bei 37°C nahm die zellassoziierte Radioaktivität mit einer Halbwertszeit $t_{1/2}$ = 28 h ± 3 h, bei 27°C mit einer Halbwertszeit $t_{1/2}$ = 60 h ± 4 h ab.

CCA hatte auch keinen Einfluß auf die Abspaltung des Oberflächenmantels bei 37°C. Die Halbwertszeit des zellassoziierten VSG und des gesamten VSG-Pools blieb fast unverändert (37°C - CCA, $t_{1/2}$ = 32 h ± 3 h, 37°C + CCA, $t_{1/2}$ = 25 h ± 3 h bzw. $t_{1/2}$ = 189 ± 24 h und $t_{1/2} \rangle$ 200 h).

Bei 27°C ohne CCA verlangsamte sich die Abspaltung des Oberflächenmantel, die Halbwertszeit des zellassoziierten VSG betrug $t_{1/2}$ = 107 h ± 2 h. Die Halbwertszeit des gesamten VSG-Pools

Tabelle 7: Halbwertszeiten der zellassoziierten Radioaktivität, des zellassoziierten VSG, und des gesamten VSG-Pools.

Kulturbedingungen	Halbwertszeit der zellassoziierten Radioaktivität	Halbwertszeit des zellassoziierten VSG	Halbwertszeit des gesamten VSG-Pools
37°C - CCA	28 h ± 1 h	32 h ± 3 h	189 ± 24 h
37°C + CCA	28 h ± 3 h	25 h ± 3 h	>200 h
27°C - CCA	60 h ± 4 h	107 h ± 2 h	>200 h
27°C + CCA	60 h ± 4 h	13 h ± 0 h	>200 h

In zwei unabhängigen Experimenten wurden Trypanosomen mit ^{35}S-Methionin radioaktiv markiert, 16-20 h bei 37°C kultiviert, und anschließend bei 37°C ohne CCA, 37°C mit CCA, 27°C ohne CCA, und 27°C mit CCA inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde die Radioaktivität und das VSG im Zellysat und im Medium bestimmt, und anschließend die Halbwertszeiten (± Standardabweichung des Mittelwerts) berechnet.

blieb unverändert ($t_{1/2} > 200$ h). Die schnelle Abspaltung des Oberflächenmantels erfolgte also nur bei 27°C in Gegenwart von CCA ($t_{1/2} = 13$ h ± 0 h), wenn die Blutformzellen zu unbemantelten procyclischen Zellen differenzierten. Unter allen anderen Bedingungen blieben die Zellen bemantelt. Insgesamt sprechen diese Experimente dafür, daß die Abspaltung des Oberflächenmantels bei der Differenzierung ein spezifischer Prozeß ist.

Dieser Schluß konnte durch eine weitere Beobachtung bestätigt werden. Wie in Abbildung 24, Bahn 5, zu sehen befand sich bei diesen Kulturbedingungen nicht nur intaktes lösliches VSG im Medium, sondern auch ein proteolytisches Spaltprodukt. Bei allen anderen Kulturbedingungen konnte nur intaktes VSG im Medium nachgewiesen werden (Abb. 24). Dasselbe Ergebnis wurde in Transformationsexperimenten mit den Trypanosomenvarianten MiTat 1.2, Antat 1.1 und Antat 1.8 gefunden (Abb. 25). AnTat 1.8 besitzt

dasselbe Oberflächenantigen wie die Variante MiTat 1.4. Die proteolytische Spaltung des VSG während der Transformation ist also kein variantenspezifisches Phänomen, sondern kann immer dann beobachtet werden, wenn der Oberflächenmantel bei der Differenzierung der Blutformen zu procyclischen Zellen abgespalten wird.

Eine nähere kinetische Analyse sollte Aufschluß darüber geben, in welcher Beziehung das im Medium auftretende sVSG und sein Spaltprodukt stehen. Dazu wurden mit (^{35}S)-Methionin markierte

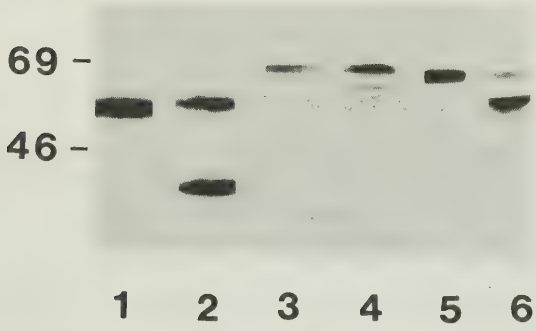


Abbildung 25: Autoradiogramm nach elektrophoretischer Auftrennung von immunpräzipitiertem VSG.
Trypanosomen der Variante MiTat 1.2 (Bahn 1,2), AnTat 1.1 (Bahn, 3,4) und AnTat 1.8 (Bahn 5,6) wurden mit (^{35}S)-Methionin markiert und in einem Transformationsexperiment eingesetzt. Das Experiment mit der Variante AnTat 1.1 wurde durchgeführt, wie in Abschnitt 2.10. für die Variante MiTat 1.4 beschrieben. Die Transformation verlief ähnlich wie die der Variante MiTat 1.4. Die Varianten AnTat 1.8 und MiTat 1.2 wurden direkt aus dem Blut infizierter Mäuse in DTM-Medium, 15% iFCS, mit CCA überführt und bei 27°C kultiviert. Die Zellen transformierten langsamer als die Varianten MiTat 1.4 und Antat 1.1. Nach 48 h bei 27°C wurden Zellen und Medium wurden durch Zentrifugation getrennt, und das VSG im Zellysat (Bahn 1,3,5) und im Medium (Bahn 2,4,6) immunpräzipitiert

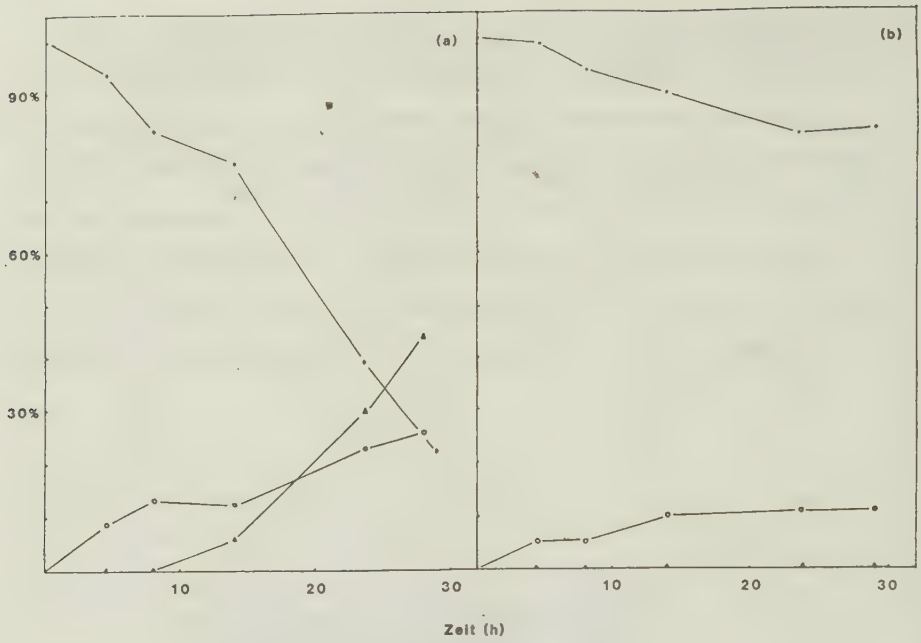


Abbildung 26: Abspaltung des Oberflächenmantels während der Transformation.
Trypanosomen wurden mit (^{35}S)-Methionin radioaktiv markiert, über Nacht bei 37°C kultiviert, dann in neues Medium überführt und bei 27°C mit (a) und ohne CCA (b) inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Zellen und Medium durch Zentrifugation getrennt, das VSG im Zellysat und Medium immunpräzipitiert und elektrophoretisch aufgetrennt. sVSG und das proteolytische Spaltprodukt des VSG wurden aus dem Gel ausgeschnitten, mit Protosol verdaut, und die Radioaktivität im Szintillationszähler bestimmt. (●-●) zellassoziiertes VSG, (○-○) sVSG im Medium, (▲-▲) Spaltprodukt des sVSG.

Trypanosomen über Nacht bei 37°C kultiviert, dann in neues Medium überführt und bei 27°C mit und ohne CCA inkubiert.

Bei 27°C ohne CCA wurden innerhalb von 30 h 17% des radioaktiven VSG ins Medium abgegeben, in Gegenwart von CCA 78% (Abb. 26). Während die Zellen ohne CCA nicht transformierten und bemantelt blieben, differenzierten sie in Gegenwart von CCA zu unbemantelten procyclischen Zellen. Nach 30 h waren mehr als 95% der Zellen unbemantelt.

Nach elektrophoretischer Auftrennung von sVSG und seinem proteolytischem Spaltprodukt wurden die Banden aus dem Gel ausgeschnitten, mit Protosol verdaut und im Scintillationszähler quantifiziert. In Abwesenheit von CCA konnte nur intaktes sVSG nachgewiesen werden. In Gegenwart von CCA konnte zuerst nur sVSG nachgewiesen werden, nach acht Stunden Inkubation bei 27°C aber zunehmend auch das proteolytische Spaltprodukt. Nach 30 h Inkubation bei 27°C in Gegenwart von CCA lag ungefähr 1/3 des VSG im Medium in der Form von sVSG und ungefähr 2/3 in der Form des Spaltprodukts vor. Dieses Verhältnis veränderte sich auch nach längerer Inkubation der Zellen nicht mehr, bereits ins Medium abgegebenes sVSG blieb intakt. Die für die proteolytische Spaltung verantwortliche Protease scheint also zellassoziiert zu sein. Auch gereinigtes, (^{35}S)-Methionin markiertes sVSG wurde nach Zugabe zum Medium einer transformierenden Trypanosomenkultur nicht proteolytisch gespalten. Bei der Abspaltung des Oberflächenmantels konnte im Medium nur ein proteolytisches, N-terminales Spaltprodukt des VSG (M_r = 51 000) nachgewiesen werden. Der Verbleib des C-terminalen Restes ist unklar. Möglicherweise wird er intra- oder extrazellulär abgebaut.

Diese Versuchsergebnisse zeigen, daß die schnelle Abspaltung des Oberflächenmantels bei der Transformation von Blutformen zu procyclischen Zellen durch das Auftreten eines Spaltproduktes charakterisiert ist. Bereits abgegebenes sVSG ist nicht der Vorläufer dieses Fragments. Die Frage, ob die Spaltung von mfVSG in sVSG durch die GPI-PLC für den Abwurf des Oberflächenmantels bei der Differenzierung von Bedeutung ist, bleibt offen.

3.3.4. Verschwinden der GPI-PLC während der Transformation

Die GPI-PLC kann sowohl in Blutformen als auch in metacyclischen Trypanosomen (209) nachgewiesen werden, nicht aber in etablierten procyclischen Zellen (111), die keinen Oberflächenmantel besitzen. In Hinblick auf die mögliche Rolle der GPI-PLC beim Mantelabwurf während der Transformation, war es von Interesse, die Kinetik, mit der dieses Enzym während der Differenzierung aus den Zellen verschwindet, zu untersuchen. Die in der Abbildung 16 zusammengefassten Ergebnisse von acht Transformationsexperimenten zeigen, daß die Synthese der GPI-PLC während der Transformation reprimiert wird. Blutformen wurden über Nacht bei 37°C und dann bei 27°C in der Gegenwart von CCA kultiviert. Unter diesen Bedingungen transformierten die Zellen. Im oberen Teil ist die Wachstumskurve der Blutformen bei 37°C (-17-0 h) und der procyclischen Zellen bei 27°C (0-120 h) gezeigt. Der pro-

Tabelle 8: Bestimmung der GPI-PLC Aktivität in transformierenden Zellen

Inkubationszeit bei 27°C	bemantelte Zellen vor/nach der Protein A Sepharose Säule	GPI-PLC Aktivität vor/nach der Protein A Sepharose Säule
(h)	(%)	(%)
0	100	100
24	39.0 ± 11.0/2.0 ± 1.0	47.2 ± 5.2/39.4 ± 9.2
48	7.4 ± 2.4/1	18.0 ± 3.6/16.2 ± 3.8
72	3.8 ± 1.7/0.5	7.3 ± 2.4/ 4.8 ± 0.9

Trypanosomen wurden 17 h bei 37°C kultiviert und anschließend bei 27°C in Gegenwart von CCA inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde die Aktivität der GPI-PLC in den Zellen bestimmt. 100% entsprechen 22 pmol mfVSG min^{-1} 10^{-8} Zellen.

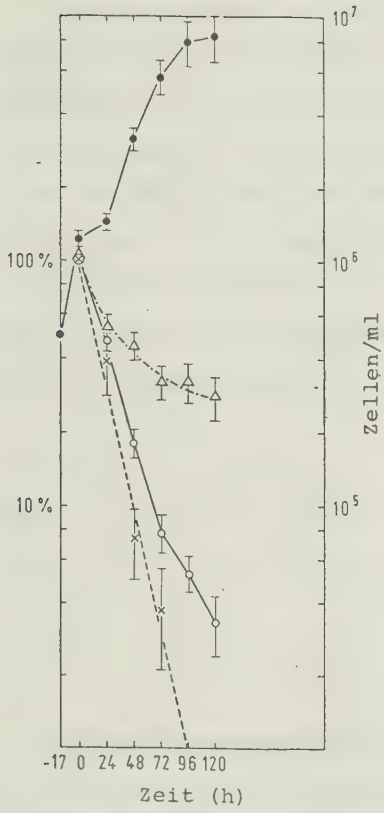


Abbildung 27: Bestimmung der GPI-PLC Aktivität während der Transformation.
In acht unabhängigen Transformationsexperimenten wurden Trypanosomen 17 h bei 37°C (-17-0 h) und bei 27°C in der Gegenwart von CCA (0-120 h). Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde die Zellzahl (-), der Prozentsatz der bemantelten Zellen (-) und die GPI-PLC Aktivität bestimmt.
(-)relative Aktivität/Zelle, (-) relative Aktivität/ml Kultur, 100% entsprechen 22 pmol mfVSG min^{-1} 10^{-8} Zellen. Die Balken geben die Standardabweichung des Mittelwertes an.

zentuale Anteil bemantelter Zellen (x-x) nahm exponentiell mit einer Halbwertszeit von ungefähr 14 h ab. Gleichzeitig (0-120 h) sank die Enzymaktivität pro Zelle mit einer Halbwertszeit von ungefähr 18 h auf weniger als 4%. Die Enzymaktivität pro ml Medium sank im selben Zeitraum auf 70% der Ausgangsaktivität (Δ-Δ), wobei sich keine GPI-PLC Aktivität im Medium nachweisen ließ. Da in den Zellen selbst nach 120 h noch GPI-PLC Aktivität nachgewiesen werden konnte, obwohl bereits alle Zellen ihren Oberflächenmantel verloren hatten, verschwand die GPI-PLC offensichtlich nicht gleichzeitig mit dem Oberflächenmantel aus den Zellen. Um dies zu bestätigen, wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten noch bemantelte und bereits unbemantelte Zellen getrennt. Dazu wurden die Zellen mit anti-VSG Antiserum inkubiert und anschließend auf eine Protein A 6MB Säule aufgetragen. Nur

bemantelte Zellen wurden auf der Säule zurückgehalten. Die unbemantelten Zellen im Durchlauf wurden lysiert und die GPI-PLC Aktivität im Zellysat bestimmt. Wie in Tabelle 8 zu sehen, unterscheidet sich die GPI-PLC Aktivität in bereits unbemantelten Zellen kaum von der Aktivität in der Ausgangspopulation, das heißt, auch die bereits unbemantelten Zellen enthalten noch das Enzym. Diese Ergebnisse zeigen, daß die GPI-PLC aus den Zellen verschwindet, indem nach der Repression der Synthese eine Teil des Enzyms abgebaut, der verbleibende Rest während anschließender Zellteilungen ausverdünnt wird.

4. Diskussion

4.1. Eigenschaften der GPI-PLC

Die GPI-PLC ist ein integrales Membranprotein, das mfVSG in sVSG und 1,2-Dimyristoylglycerin spaltet, sie ist also ein Phospholipase C-ähnliches Enzym. Die Assoziation des Enzyms mit Membranen wurde auch von Turner (210) und von Ferguson und Cross (122,124) nachgewiesen. Da das Enzym durch pCMBS inhibiert wird (111), kann mfVSG gereinigt werden. Inkubiert man gereinigtes (^{3}H)Myristoyl-mfVSG mit einem Detergenslysat von Trypanosomen, wird radioaktives 1,2-Dimyristoylglycerin freigesetzt, das mit Hexan:Isopropanol (3:2) extrahiert werden kann. Dabei ist die Menge der abgespaltenen Radioaktivität von der zugegebenen Lysatmenge abhängig (Abb. 10). Obwohl bei längerer Inkubation mit einem Detergensextrakt freie Myristinsäure entsteht, kann die Aktivität der GPI-PLC in einem Detergenslysat bestimmt werden, weil die Abspaltung der Myristinsäure viel langsamer verläuft

als die Abspaltung des 1,2-Dimyristoylglycerins (Abb. 11).

Die GPI-PLC besteht aus einer Polypeptidkette mit einem apparenten Molekulargewicht M_r = 39 000. Das Protein wurde mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers in einem Schritt gereinigt. Nach der Elution bei pH 12 von der Affinitätssäule wurde eine teilweise Umwandlung in ein Protein mit dem Molekulargewicht M_r = 42 000 Protein beobachtet (Abb. 13). Wodurch diese künstliche Umwandlung hervorgerufen wird, ist unklar. Sie ist jedoch eindeutig ein Artefakt der drastischen Elutionsbedingungen.

Das gereinigte Protein wurde jodiert und mit einem zweiten monoklonalen Antikörper, der nicht für die Reinigung verwendet worden war, immunpräzipitiert. Da sowohl das M_r=39 000 Protein präzipitiert wurde (Abb. 14), als auch die gesamte GPI-PLC Aktivität, ist das M_r = 39 000 Protein mit der GPI-PLC identisch. Auch polyklonale Antikörper gegen das gereinigte Protein präzipitierten aus einem Detergensextrakt von Trypanosomenmembranen das M_r = 39 000 Protein (Abb.16). Dieses Antiserum enthielt Antikörper, die die Aktivität der GPI-PLC inhibieren.

Hereld et al. (211) reinigten aus T. brucei unabhängig ein Protein mit dem Molekulargewicht M_r = 37 000, das mfVSG in sVSG und 1,2-Dimyristoylglycerin spaltet. Die Bestimmung des Stokes Radius durch Gelfiltration auf einer Sephacryl S 200 Säule in der Gegenwart von CHAPS ergab 2.6 nm, das errechnete Molekulargewicht einen Wert M_r = 47 000. Da die GPI-PLC, wie die Autoren zeigen konnten, CHAPS bindet, zeigen diese Versuchsergebnisse, daß das Enzym als Monomer vorliegt.

Aus 1.4×10^{11} Trypanosomen konnten 76 µg GPI-PLC isoliert werden, die Ausbeute betrug 32%. Wenn man annimmt, daß alle gereinigten GPI-PLC Moleküle aktiv sind, enthalten 1.4×10^{11} Trypanosomen 238 µg oder 6 nmol GPI-PLC. Dies entspricht 27 000

Molekülen pro Zelle. Die höchste Aktivität der GPI-PLC in dem verwendeten Test war 2 µmol min^{-1} mg^{-1} (Abb. 15). Da ungefähr 1.17×10^7 mfVSG Moleküle die Oberfläche eines Trypanosoms bedecken (212), würde es etwa 5 Minuten dauern, bis die GPI-PLC eines Trypanosoms alle mfVSG Moleküle an der Oberfläche der Zelle gespalten hat. Aus zwei Gründen dürften diese Werte die wahre Aktivität wesentlich unterschätzen. Erstens wurden fast 50% der GPI-PLC bei der Elution von der Affinitätssäule inaktiviert (Tabelle 6) und zweitens läuft die Reaktion in einer Membran wesentlich schneller ab als in detergenshaltigem Puffer. Dies kann sowohl aus den Ergebnissen der Rekonstiutionsexperimente (Abschnitt 3.1.9.) als auch aus den Untersuchungen der Abspaltung des Oberflächenmantels bei Zellyse (Abb. 22) geschlossen werden. Die Maximalgeschwindigkeit des Enzyms bleibt daher unbekannt.

Die Aktivität und Spezifität von Phospholipasen ist oft von den Testbedingungen (Detergenskonzentration, Lipidaktivatoren, Salzkonzentration) abhängig. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, daß sich die Substratspezifität der GPI-PLC unter physiologischen Bedingungen verändert. Die Untersuchungen der Substratspezifität der GPI-PLC machen es aber sehr wahrscheinlich, daß mfVSG auch unter physiologischen Bedingungen das Substrat dieses Enzyms ist. Die GPI-PLC aus T. brucei spaltet neben mfVSG das C-terminale Fragment von mfVSG, das nach Pronase Behandlung von mfVSG isoliert werden kann, lyso-mfVSG (213), gp 63 von Leishmania (147), Acetylcholinesterase von Tropedo und Menschen (156), das Oberflächenprotein von Paramecium (148), Decay accelerating factor (214) und die Modulatoren der cAMP-Phosphodiesterase (157,158). Phosphatidylinositol wird aber nur 170-mal langsamer gespalten als mfVSG, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylcholin oder Phosphatidylglycerol dienen nicht als Substrat. Im Gegensatz

dazu spaltet die Phosphatidylinositol spezifische Phospholipase C von Bacillus cereus, Bacillus thurigiensis (215) und Staphylococcus aureus (216) sowohl Phosphatidylinositol als auch die glykosilierte Form von Phosphatidylinositol, die im Glykolipidmembrananker dieser Proteine vorliegt. Die GPI-PLC weist also eine Spezifität für Glykophosphatidylinositol auf und wurde daher Glykophosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C genannt.

Die GPI-PLC unterscheidet sich von anderen Phosphatidylinositol-spezifischen Phospholipasen C in mehreren Punkten. Erstens ist sie membrangebunden, während die bakteriellen Enzyme im Kulturfiltrat auftreten. Zweitens hat die GPI-PLC ein pH-Optimum um pH 8.0, während das pH-Optimum der meisten anderen Phosphatidylinositol spezifischen Phospholipasen C bei pH 7.0 oder niedriger liegt. Ähnlich den meisten bakteriellen Phospatidylinositol spezifischen Phospholipasen C, aber im Gegensatz zu den Säugetierenzymen benötigt die GPI-PLC kein Ca^{++} als Cofaktor.

4.2. Lokalisation der GPI-PLC in der Zelle

Die Lokalisation der GPI-PLC in der Zelle ist immer noch unklar, wahrscheinlich ist dieses Enzym aber entweder in intrazellulären Vesikeln oder auf der Innenseite der Plasmamembran lokalisert. Diese Aussage beruht auf folgenden Beobachtungen:

Die Rekonstituionsexperimente (Abschnitt 3.1.9.) haben gezeigt, daß das Enzym sein Substrat nur dann spalten kann, wenn sich beide Partner in der selben Lipiddoppelschicht befinden. Wahrscheinlich kann die GPI-PLC, wie andere Phospholipasen (217), nur solche mfVSG-Moleküle spalten, die in einer Membran diesselbe Orientierung einnehmen wie das Enzym. Falls das Enzym auf der Aussenseite der Plasmamembran lokalisiert wäre, müßte es in

einem inaktiven Zustand vorliegen, da sonst der Oberflächenmantel des Parasiten schnell abgespalten würde. Gegen eine solche Lokalisation spricht, daß die GPI-PLC durch Trypsinbehandlung intakter Zellen nicht inaktiviert wurde, obwohl dabei das VSG und wahrscheinlich auch andere an der Oberfläche des Parasiten befindliche Proteine proteolytisch gespalten wurden (Abb. 17 und 18). Daher muß man davon ausgehen, daß die GPI-PLC nicht an der Oberfläche des Parasiten exponiert ist, sondern etweder auf der Innenseite der Plasmamembran in intrazellulären Vesikeln lokalisiert ist. Für eine Lokalisation der GPI-PLC in der Plasmamembran sprechen die Beobachtungen, die bei Zellyse gemacht wurden, für eine Lokalisation in intrazellulären Vesikeln die Ergebnisse der Zellfraktionierung und der Immunfluorezenz.

Bei Zellyse wird das mfVSG der Plasmamembran schnell in sVSG gespalten (Abb. 22). "Pulse-chase" Experimente haben gezeigt, daß de novo synthetisiertes mfVSG, das sich noch nicht in der Plasmamembran befindet, bei Zellyse nicht für die GPI-PLC zugänglich ist (218). Wenn die GPI-PLC von innen in die Plasmamembran eingebettet ist, könnten sich Enzym und Substrat bei Zellyse über Membranbruchstellen vermischen (wegen des assoziierten Tubulinnetzwerks kann sich die Plasmamembran nicht zu geschlossenen Vesikeln abrunden). Dies würde auch erklären, warum es nicht möglich war Lysebedingungen zu finden, bei denen das mfVSG nicht gespalten wurde.

Die Zellfraktionierungsexperimente haben gezeigt, daß sich die Verteilung der GPI-PLC Aktivität nach Saccharosedichtegradientenzentrifugation von Trypanosomenmembranen von der der Plasmamembranenzyme α-D-Glukosidase und 3'-Nukelotidase unterscheidet (Abb. 19). Die Verteilung der GPI-PLC Aktivität blieb unverändert, wenn anstelle von 25 mM Tris-HCl als Homogenisierungs-

puffer 1 mM Imidazole verwendet wurde. Dabei veränderte sich aber die Dichte der Plasmamembran. Unter der Vorraussetzung, daß die α-D-glucosidase und die 3'-Nukleotidase tatsächlich in der Plasmamembran lokalisiert sind, sprechen diese Versuchsergebnisse dafür, daß die GPI-PLC kein typisches Plasmamembranenzym ist.

Bei der Markierung schwach fixierten Trypanosomen mit dem monoklonalen Antikörper mAT 3 und dem Biotin-Streptavidin-FITC System wurde nicht einheitlich die Plasmamembran markiert, sondern die Zellen erschienen gepunktet (Abb. 21). Diese Befunde müssen aber sehr vorsichtig interpretiert werden, da die Zellen nur sehr schwach fixiert waren. Auch diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß die GPI-PLC nicht in der Plasmamembran lokalisiert ist.

Diese widersprüchlichen Befunde können nur durch Immunelektronenmikroskopische Untersuchungen geklärt werden. Versuche dazu waren bisher nicht erlogreich.

4.3. Funktion der GPI-PLC

Die GPI-PLC kann sowohl in Blutformen (111,122,125) als auch in metacyclischen Trypanosomen (209) nachgewiesen werden. Während der Transformation zu procyclischen Zellen wird ihre Synthese reprimiert, eine Teil der GPI-PLC wird abgebaut, der Rest während anschließender Zellteilungen ausverdünnt (Abb. 27). In etablierten procyclischen Zellen ist das Enzym nicht nachweisbar. Die GPI-PLC wird also immer dann exprimiert, wenn der Parasit bemantelt ist. Welche physiologische Funktion könnte dieses Enzym erfüllen?

Da die enzymatische Aktivität, die mfVSG in sVSG und 1,2-Dimyristoylglycerin spaltet, mit einem monoklonalen Antikörper gegen die GPI-PLC vollständig präcipitiert werden konnte, ist die GPI-PLC das einzige Enzym in einem Trypanosomenlysat, das die Konversion von mfVSG zu sVSG katalysiert. Diese Konversion kann durch pCMBS, einen Inhibitor der GPI-PLC, gehemmt werden (111). Daher muß die GPI-PLC für die Konversion von mfVSG zu sVSG bei Zellyse verantwortlich gemacht werden. Auch die langsame kontinuierliche Abspaltung von sVSG, wie sie bei der in vitro Kultivierung von Blutformen beobachtet wurde, wird wahrscheinlich von der GPI-PLC katalysiert (Abb. 23,24). Black et al. (183) konnten VSG im Blut infizierter Tiere erst dann nachweisen, wenn die sich teilenden Blutformen zu seneszenten "stumpy" Formen, die sich nicht mehr teilen, differenzierten. Bei der in vitro Inkubation von Blutformen für neun Stunden bei 37°C fanden sie kein VSG im Medium. Sie nahmen daher an, daß das VSG im Blut ausschließlich von "stumpy" Trypanosomen stammt, die es wahrscheinlich bei Zellyse abgeben. Verbesserte Zellkuturbedingungen ermöglichten es nun Blutformen zu kultivieren und nachzuweisen, daß diese Zellen 2% ihres Oberflächenmantels pro Stunde ins Medium abgeben (Abschnitt 3.3.2.). Wahrscheinlich erfolgt diese kontinuierliche Abgabe von VSG auch im Blut des infizierten Tieres.

Diese langsame Abspaltung des Oberflächenmantels von Blutformzellen könnte prinzipiell auf zwei Arten erfolgen. Zum einen könnte sie, wie bei der Abspaltung des Oberflächenmantels bei Zellyse, in der Plasmamembran ablaufen. Es wäre aber auch möglich, daß mfVSG-haltige Vesikel nach Endozytose mit GPI-PLC-haltige Vesikeln fusionieren, woraufhin das mfVSG in sVSG gespalten wird. Das sVSG würde anschließend durch Exozytose ins

Medium abgegeben werden. Die endgültige Aufklärung der Lokalisation der GPI-PLC in der Zelle wird es vielleicht ermöglichen zwischen diesen beiden Mechanismen zu unterscheiden.

Die physiologische Bedeutung der kontinuierlichen Abgabe von VSG ins Blut, beziehungswiese der Abspaltung des VSG bei Zellyse ist noch unklar. Das abgegebene VSG könnte bei den vielfältigen Störungen des Immunsystems, wie sie für eine Trypanosomeninfektion typisch sind, eine Rolle spielen (184,185). Isoliertes VSG hat keine immunsuppressive Wirkung, induziert aber eine polyklonale Stimulation von Lymphocyten (219).

Die kontinuierliche Abspaltung des VSG hat für den Wechsel des Oberflächenantigens bei der antigenen Variation keine Bedeutung. Bei diesem Wechsel des Oberflächenmantels wird das alte Oberflächenantigen nicht abgespalten, sondern es findet eine Vermischung von altem und neu synthetisiertem VSG statt (55). Die Messungen des "VSG-turnover" haben ergeben, daß VSG fast überhaupt nicht metabolisiert wird. Das alte VSG verschwindet von der Zelloberfläche im wesentlichen dadurch, daß es bei den anschließenden Zellteilungen ausverdünnt wird. Die langsame kontinuierliche Abspaltung des VSG hat auf die Geschwindigkeit des Verschwindens des alten VSGs fast keinen Einfluß. Allein durch Zellteilung würden in zehn Generationen (80 h) 99.9% des alten, nicht mehr synthetisierten VSGs von der Zelloberfläche verschwinden. Eine langsame Abspaltung von 2% des Oberflächenmantels pro Stunde verkürzt diesen Zeitraum um nur 2 Generationen auf acht (64 h).

Ob die Spaltung von mfVSG in sVSG für den Abwurf des Oberflächenmantels während der Transformation bemantelter Blutformen zu unbemantelten procyclischen Zellen von Bedeutung

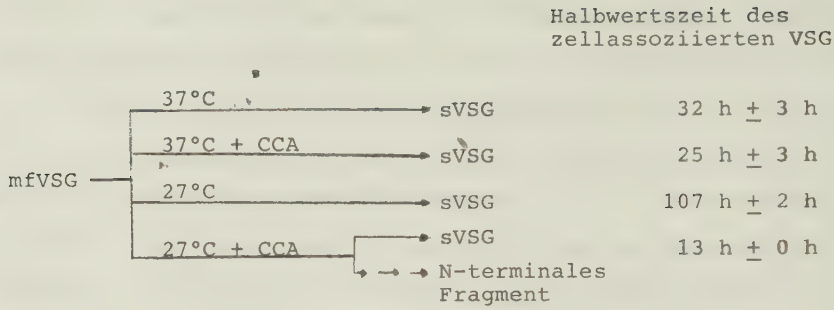


Abbildung 28: Schematische Zusammenfassung

ist, bleibt unklar. In vitro kann dieser Differenzierungsschritt durch zwei Signale, das Absenken der Temperatur und die Zugabe von Citrat/cis-Aconitat (CCA) zum Medium, ausgelöst werden. Dabei vermindert sich die Halbwertszeit des zellassoziierten VSG von $t_{1/2}$ = 32 h ± 3 h auf $t_{1/2}$ = 13 h, der Oberflächenmantel wird schnell vollständig abgespalten (Abb. 28). Gibt man den Zellen nur eines der beiden Signale, transformieren sie unvollständig (siehe Abschnitt 1.8.). Bei 37°C + CCA verändert sich die Halbertszeit des zellassoziierten VSG nur wenig ($t_{1/2}$ = 25 h ± 3 h), bei 27°C - CCA wird die Abspaltung von VSG wesentlich langsamer ($t_{1/2}$ = 107 h ± 2 h). Die schnelle Abspaltung des Oberflächenmantels kann nur beobachtet werden, wenn die Blutformen zu procyclischen Zellen differenzieren und ist durch das Auftreten eines proteolytischen Spaltprodukts des VSG charakterisiert (Abb. 26). Die proteolytische Spaltung des VSG ist kein variantenspezifisches Phänomen, sondern tritt stets bei der Abspaltung des Oberflächenmantels während der Transformation auf (Abb. 24,25). Die dafür verantwortliche Protease ist zellassoziiert, weil bereits abgespaltenes sVSG oder von außen zugegebenes VSG nicht proteolytisch gespalten wird.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die GPI-PLC in Trypansoma brucei immer dann exprimiert wird, wenn die Zellen bemantelt sind. Sie ist für die Spaltung von mfVSG in sVSG, wie sie bei Zellyse, der Kultivierung von Blutformen, und während der Transformation beobachtet werden kann, verantwortlich. Das ins Blut des infizierten Tieres abgegebene VSG könnte an Störungen des Immunsystems beteiligt sein. Beim Wechsel des Oberflächenantigens während der antigenen Variation spielt die GPI-PLC vermutlich keine Rolle. Bei der schnellen Abspaltung des Oberflächenmantels während der Transformation wird neben sVSG auch ein proteolytisches Spaltprodukt des VSG ins Medium abgegeben. Unklar bleibt, ob die Spaltung von mfVSG in sVSG für diesen schnellen Abwurf des Oberflächenmantels von Bedeutung ist.

5. Zusammenfassung

Die Plasmamembran von Trypanosoma brucei ist im Blut des Säugetierwirts, von einem dichten Oberflächenmantel bedeckt. Dieser Oberflächenmantel besteht aus einem Glykoprotein, dem sogenannten varianten Oberflächenglycoprotein (VSG). Die Spaltung des membrangebundenen Oberflächenglykoproteins (mfVSG) in lösliches VSG (sVSG) und 1,2-Dimyristoylglycerin wird durch eine endogene, membrangebundene Phospholipase C-ähnliche Hydrolase katalysiert. Mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers gegen dieses Enzym konnte es ungefähr 3000-fach zur Homogenität gereinigt werden. Das Enzym besteht aus einer Polypeptidkette und hat ein Molekulargewicht von 39 000. Es ist sehr spezifisch für mfVSG. Phosphatidylinositol wird mit einer 170-mal niedrigeren Rate gespalten als mfVSG. Phosphatidylethanolamin, Phospatidylcholin, Phosphatidylglycerol dienen nicht als Substrat. Wegen seiner Spezifität für Glykophosphatidylinositol wurde das Enzym Glykophosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C (GPI-PLC) genannt. Rekonstitutionsexperimente haben gezeigt, daß die GPI-PLC mfVSG nur dann spalten kann, wenn sich Enzym und Substrat in der selben Phospholipiddoppelschicht befinden.

Die Lokalisation der GPI-PLC ist unklar. Durch Trypsinbehandlung von Trypanosomen konnte jedoch gezeigt werden, daß das Enzym nicht an der Zelloberfläche exponiert ist. Die Ergebnisse von Zellfraktionierungsexperimenten und Immunfluoreszenzmarkierung sprechen dafür, daß die GPI-PLC in intrazellulären Vesikeln lokalisiert ist. Die Untersuchung der Abspaltung des Oberflächenmantels bei Zellyse deutet aber darauf hin, daß das Enzym auf der Innenseite der Plasmamembran lokalisiert ist.

Die GPI-PLC wird immer dann exprimiert, wenn die Plamamembran

der Zellen von einem Oberflächenmantel aus VSG-Molekülen bedeckt ist. Das Enzym ist für die Spaltung von mfVSG in sVSG, wie sie bei Zellyse, der Kultivierung von Blutformen, und während der Transformation beobachtet werden kann, verantwortlich. Das ins Blut des infizierten Tieres abgegebene VSG ist vielleicht an den vielfältigen Störungen des Immunsystems, wie sie für eine Trypanosomeninfektion typisch sind, beteiligt. Beim Wechsel des Oberflächenantigens während der antigenen Variation spielt die GPI-PLC keine Rolle. Die schnelle Abspaltung des Oberflächenmantels während der Transformation bemantelter Blutformen zu unbemantelten procyclischen Zellen ist durch das Auftauchen eines proteolytischen Spaltprodukts des VSG charakterisiert. Die Bedeutung der Spaltung von mfVSG in sVSG für diesen schnellen Abwurf des Oberflächenmantels bleibt unklar.

6. Referenzen

1) Boothroyd, J.C. (1985) Annu.Rev.Microbiol 39, 475-501

2) Donelson, E., and Rice-Ficht, A.C. (1985) Microbiological Reviews 49, 107-125

3) Pays, E. (1985) Prog.Nucl.Acid Res.Mol Biol. 32, 1-23

4) Borst, P. (1986) Ann.Rev.Biochem.55, 701-732

5) Opperdoes, F.R., and Borst,P. (1977) FEBS Letters 80, 360-364

6) Opperdoes, F.R., Baudhuin, P., Coppens, J., De Roe, C., Edwards, S.W., et al. (1984) J.Cell.Biol 98, 1178-1184

7) Opperdoes, F.R. (1985) Brit.Med.Bull. 41, 130-136

8) Stuart, K. (1983) Mol.Biochem.Parasitol. 9, 93-104

9) Simpson, L. (1986) Int.Rev.Cyt. 99, 119-179

10) Lumsden, W.H.R., and Evans, D.A. (1976) Biology of the Kinetoplastida, Academic Press, New York

11) Rifkin, M.R. (1978) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 75, 3450-3454

12) Vickerman, K., and Preston, T.M. (1976) in Biology of the Kinetoplastida (Lumsden,W.H.R., and Evans, D.A., eds.) Vol.1, pp. 1-34, Academic Press, New York

13) Robertson, M. (1912) Proc.R.Soc.Ser.B. 85, 527-539

14) Barry, J.D., and Vickerman, K. (1979) Exp.Parasitol. 48, 313-324

15) Cross, G.A.M. (1975) Parasitology 71, 393-417

16) Vickerman, K., and Luckins, A.G. (1969) Nature 224, 1125-1127

17) Brown, R.C., Evans, D.A., and Vickerman, K. (1973) Int.J. Parasitol. 3, 691-704

18) Seed, J.R. (1964) Parasitology 54, 593-596

19) Le Ray, D., Barry, J.D., and Vickerman, K. (1978) Nature 273, 300-302

20) Vickerman, K. (1969) J.Cell.Sci. 5, 163-193

21) Wijers, D.J.B. (1957) Nature 180, 391-392

22) Wijers, D.J.B., and Willet, K.C. (1960) Am.Trop.Med. Parasitol. 54, 341-350

23) Doyle, J.J., Hirumi, H., Hirumi, K., Lupton, E.N, and Cross, G.A.M. (1980) Parasitology 80, 359-369

24) Van der Ploeg, L.H.T., Valerio, D., De Lange, T., Bernards, A., Borst, P., and Grasveld, F.G. (1982) Nucl.Adids Res. 10, 5905-5923

25) Capbern, A., Giraud, C., Baltz, T., and Mattern, P.(1977) Exp.Parasitol. 42, 6-13

26) De Lange, T., Kooter, J.M., Luirink, J., and Borst,P. (1985) EMBO J. 4, 3299-3306

27) Michels, P.A.M., Liu, A.Y.C., Bernards, A., Sloof, P., Van der Bijl, M.M.W., et al. (1983) J.Mol.Biol. 166, 537-556

28) Liu, A.Y.C., Michels, P.A.M., Bernards, A., and Borst, P. (1985) J.Mol.Biol. 182, 383-396

29) Donelson, J.E., Murphy, W.J., Brentano, S.T., Rice-Ficht, A.C., and Cain, G.D. (1983) J.Cell.Biochem. 23, 1-12

30) Myler, P.J., Allison, J., Agabian, N., and Stuart, K. (1984) Cell 39, 203-211

31) Laurent, M., Pays, E., Van der Werf, E., Allison, A., Aerts, D., Magnus, E., et al. (1984) Nucl.Acids Res. 12, 8319-8329

32) Aline, R.J., Mac Donald, G., Brown, E., Allison, J., Myler, P., et al. (1985) Nucl.Acids Res. 13, 3161-3177

33) De Lange, T., Kooter, J.M., Michels, P.A.M., and Borst, P. (1983) Nucl.Acids Res. 11, 8149-8165

34) Pays, E., Van Assel, S., Laurent, M., Darville, M., Vervoot, T., et al. (1983) Cell 34, 371-381

35) Pays, E., Delauw, M.F., Van Assel, S., Laurent, M., Vervoot, T., et al. (1983) Cell 35, 370-373

36) Laurent, M., Pays, E., Delinte, K., Magnus, E., and Van Meirvenne, N. (1984) Nature 308, 282-285

37) Longacre, S., Hiber, U., Raibaud, A., Eisen, H., Baltz, T., et al. (1983) Mol.Cell.Biol. 3, 399-409

38) Allison, J., Rothwell, V., Newport, G., Agabian, N., and Stuart, K., (1984) Nucl.Acids Res. 12, 9051-9066

39) Young, J.R., Miller, E.N., and Williams, R.O. (1984) J.Cell. Biochem. 24, 287-295

40) Young, J.R., Miller, E.N., Williams, R.O., and Turner, M.J. (1983) Nature 306, 196-198

41) Bernards, A., De Lange, T., Michels, P.A.M., Huisman, M.J., and Borst, P. (1984) Cell 36, 163-170

42) Bernards, A., Kooter, J.M., and Borst, P. (1985) Mol.Cell. Biol. 5, 545-553

43) Pays, E., Houard, S., Pays, A., Van Assel, S., Dupont, F., et al. (1985) Cell 42, 821-829

44) Pays, E., (1985) Proc.Nucl.Acids Res.Mol.Biol. 32, 1-26

45) Pays, E., (1985) Ann.Inst.Pasteur Immunol. 1366, 25-39

46) Pays, E., Guyaux, M., Aerts, D., Van Meirvenne, N., and Steinert, M. (1985) Nature 316, 562-564

47) Williams, R.O., Young, J.R., and Majiwa, P.A.O. (1982) Nature 299, 417-421

48) Young, J.R., Shah, J.S., Mathyssens, G., and Williams, R.O. (1983) Cell 32, 1149-1152

49) Buck, G.A., Longarce, A., Ribaud, A., Hibner, U., Giroud, C., et al. (1984) Nature 307, 563-566

50) Buck, G.A., Jacquemont, C., Baltz, T., and Eisen, H. (1984) Gene 32, 329-336

51) Michels, P.A.M., Van der Ploeg, L.H.T., Liu, A.Y.C., and Borst, P. (1984) EMBO J. 3, 1345-1351

52) Aline, R.F.Jr., Scholler, J.K., Nelson, R.G., Agabian, N., and Stuart, K. (1985) Mol.Biochem.Parasitol. 17, 311-320

53) Miller, E.N., and Turner, M.J. (1981) Parasitology 82, 63-80

54) Seed, J.R. (1978) J.Protozool. 25, 526-529

55) Esser, K.M., and Schoenbechler, M.J. (1985) Sciene 229, 190-193

56) Cornellissen, A.W.C.A., Verspieren, M.P., Toulme´, J.-J., Swinkels, B.W., und Borst, P. (1986) Nucl.Acids Res. 14, 5605-5614

57) Walder, J.A.W., Eder, P.S., Engman, D.M., Brentano, S.T., Roseanne, Y.W., Knutson, D.S., Dorfman, D.M., and Donelson, J.E. (1986) Science 233, 569-571

58) De Lange, T., Birkvens, T.M., Veerman, H.J.G., Frasch, A.C.C., Barry, J.D., et al., (1984) Nucl.Acids Res. 12, 4431-4443

59) Nelson, R.G., Parsons, M., Selkirk, M., Newport, G., Barr, P.J., et al. (1984) Nature 308, 665-667

60) Borst, P., Bernards, A., Van der Ploeg, L.H.T., Michels, P.A.M., Liu, A.Y.C., et al. (1983) in Genetic Rearrangements (Chater, K.F., Cullis, C.A., Hopwood, D.A., Johnston, A.A.W.B., and Woolhouse, H.W., eds.) pp. 203-233, London. Croom Helm

61) De Lange, T., Liu, A.Y.C., Van der Ploeg, L.H.T., Borst, P., Tromp, M., et al. (1983) Cell 34, 891-900

62) Nelson, R.G., Parsons, M., Barr, P.J., Stuart, K., and Selkirk, M. (1983) Cell 34, 901-909

63) Campbell, D.A., Thornton, D.A., and Boothroyd, J. C. (1984) Nature 311, 350-355

64) Kooter, J.M., De Lange, T., and Borst, P., (1984) EMBO J. 3, 2387-2392

65) Milhausen, M., Nelson, R.G., Sather, S., Selkirk, M., and Agabian, N. (1984) Cell 38, 721-729

66) Laird, P.W., Kooter, J.M., Loosbroek, N., and Borst, P. (1985) Nucl.Acids Res. 13, 4253-4266

67) Lenardo, M.J., Dorfman, D.M., and Donelson, J.E. (1985) Mol.Cell.Biol. 5, 2487-2490

68) Murphy, W.j., Watkins, K.P., and Agabian, N. (1986) Cell 47, 517-525

69) Sutton, R.E., and Boothroyd, J.C. (1986) Cell 47, 527-535

70) Bowman, B.R., and Flynn, J.W. (1976) in Biology of the Kinetoplastida (Lumsden, W.H.R., and Evans, D.A., eds.) Vol.1, pp 435-476, Academic Press, New York

71) Grant, P.T., and Sargent, J.R. (1960) Biochem.J. 76, 229-237

72) Fairlamb, A.H., Opperdoes, F.R., and Borst, P. (1977) Nature 265, 270-271

73) Clarkson, A.B.Jr., and Brohn, F.H. (1976) Science 194, 204-206

74) Opperdoes, F.R. (1983) in Mechanism of Drug Action (Singer, T.P., Mansour, T.E., and Undorza, R.N., eds.) pp. 121-131, Academic Press, New York

75) Hoeijmakers, J.H.J., Snijders, A., Janssen, J.W.G., and Borst, P. (1981) Plasmid 5, 329-350

76) Wallace, D.C. (1982) Microbiol.Rev. 46, 208-240

77) Simpson, A.M., Simpson, L., and Livingston, L. (1982) Mol. Biochem.Parasitol. 6, 237-252

78) Simpson, L., Spithill, T.W., and Simpson, A.M. (1982) Mol. Biochem.Parasitol. 6, 253-264

79) Johnson, B.J.B., Hill, G.C., Fox., T.D., and Stuart, K. (1982) Mol.Biochem.Parasitol. 5, 381-390

80) Stuart, K. (1983) J.Cell.Biochem.

81) Challberg, S.S., and Englund, P.T. (1980) J.Mol.Biol. 138, 447-472

82) Stuart, K., and Gelvin, S.R. (1980) J.Trop.Med.Hyg. 29, 1075-1081

83) Chen, K.K., and Donelson, J.E. (1980) Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 77, 2445-2449

84) Barrois, M., Riou, G., and Gailbert, F. (1981) Proc.Natl. Acad.Sci.U.S.A. 78, 3323-3327

85) Stuart, K.D., and Gelvin, S.B. (1982) Mol.Cell.Biol. 2, 845-852

86) Borst, P. and Hoeijmakers, J. (1979) Plasmid 2, 20-40

87) Böhringer, S., and Hecker, H. (1974) J.Protozool. 21, 694-698

88) Tobie, E.J., Brand, T., and Mehlman, B. (1950) J.Parasitol. 36, 48-54

89) Pittam, M.D. (1970) Comp.Biochem.Physiol. 33 B, 127-128

90) Cunningham, I. (1977) J.Protozool. 24, 325-329

91) Brun, R., and Schönenberger, M. (1979) Acta Tropica (Basel) 36, 289-292

92) Ghiotto, V., Brun, R., Jenni, L., and Hecker, H. (1979) Exp.Parasitol. 48, 447-456

93) Bienen, E.J., Hammadi, E., and Hill. G.C. (1981) Exp. Parasitol. 51, 408-456

94) Brun, R., and Schönenberger, M. (1981) Z.Parasitenkd. 66, 17-24

95) Overath, P., Czichos, J., Stock, U., and Nonengaesser, C. (1983) EMBO J. 2, 1721-1728

96) Simpson, A.M., Highes, D., and Simpson, L. (1985) J. Protozool. 32, 672-677

97) Czichos, J., Nonnengaesser, C., and Overath, P. (1986) Exp.Parasitol. 62, 283-291

98) Schöni, R., Jenni, L., and Brun, R. (1982) Z.Parasitenkd. 68, 1-5

99) Evans, D.A. (1979) J.Protozool. 26, 425-427

100) Hill, G.C. (1976) Biochem.Biophys.Acta 456, 149-193

101) Flynn, J.W., and Bowman, J.B.R. (1973) Comp.Biochem.Physiol. 45 B, 24-42

102) Opperdoes, F.R., Borst, P., and Spits, H. (1977) Eur.J. Biochem. 76, 21-28

103) Ryley, J.F. (1962) Biochem.J. 85, 211-223

104) Srivastava, H.K., and Bowman, I.B.R. (1971) Comp.Biochem. Physiol. 40 B, 973-981

105) Srivastava, H.K., and Bowman, I.B.R. (1972) Nature New Bioll. 235, 152-153

106) Evans, D.A., and Brown, R.C. (1972) J.Protozool. 19, 686-690

107) Overath, P., Czichos, J., and Haas, C. (1986) Eur.J.Biochem. 160, 175-182

108) Honigberg, B.M., and Gabre, B. (1972) J.Protozool. (Suppl.) Abstr.No. 32

109) Bowman, I.B.R. (1974) Ciba Foundation Symposium 20, 255-271

110) Ford, W.C.L., and Bowman, I.B.R. (1973) Transact.Royal Soc.trop.Med.Hyg. 67, 257

111) Bülow, R. (1984) Diploma Thesis, Universität Tübingen

112) Johnson, J.G., and Cross, G.A.M. (1979) Biochem.J. 178, 689-697

113) Tetley, L., Vickerman, K., and Moloo, S.K. (1981) Trans.R. Soc.trop.Med.Hyg. 75, 409-414

114) Ferrante, A., and Allison, A.C. (1983) Parasite Immunol.5, 539-546

115) Holder, A.A., and Cross, G.A.M. (1981) Mol.Biochem.Parasitol. 2, 135-150

116) Rice-Ficht, A.C., Chen, K.K., and Donelson, J.E. (1981) Nature 29, 153-157

117) Bridgen, P.J., Cross, G.A.M. and Bridgen, J. (1976) Nature 273, 613-614

118) Cross, G.A.M., and Johnson, J.G. (1976) in Biochemistry of parasites and host-parasites relationships (van den Bossche, H. ed.) pp. 413-420, North Holland Publishing, Amsterdam

119) Cross, G.A.M. (1977) Ann.Soc.Belge.Med.Trop. 57, 389-399

120) Holder, A.A. (1983) Biochem.J. 209, 261-262

121) Ferguson, M.A.J., Low, M., and Cross, G.A.M. (1985) J.Biol.Chem. 260, 14547-14555

122) Ferguson, M.A.J., Holder, K. and Cross, G.A.M. (1985) J.Biol.Chem. 260, 4963-4968

123) Strang, A.-M., Williams, J.M., Ferguson, M.A.J., Holder, A., and Allen, A.K. (1986) Biochem.J. 234, 481-484

124) Ferguson, M.A.J., and Cross, G.A.M. (1984) J.Biol.Chem. 259, 3011-3015

125) Cardoso de Almeida, M.L., and Turner, M.J. (1983) Nature 302, 349-352

126) McConnell, J., Turner, M.J., and Rovis, L. (1983) Mol.Biochem.Parasitol. 8, 119-135

127) Hubbard, S.C., and Ivatt, R.J. (1981) Annu.Rev.Biochem. 50, 555-583

128) Parodi, A.J., Quesada-Allue, L.A., and Cazzulo, J.J. (1981) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 78, 6201-6295

129) Parodi, A.J., Lederbrenner, G.Z., and Mendelzon, D.H. (1983) J.Biol.Chem. 258, 5589-5595

130) Ferguson, M.A.J., Duszenko, M., Lamont, G.S., Overath, P. and Cross, G.A.M. (1986) J.Biol.Chem. 261, 356-362 128)

131) Boothroyd, J.C., Cross, G.A.M., Hoeijmakers, J.H.J., and Borst, P. (1980) Nature 288, 624-626

132) Boothroyd, J.C., Paynter, C.A., Cross, G.A.M., Bernards, A., and Borst, P. (1981) Nucl.Acids Res. 9, 4743-4745

133) Davis, B.D., and Tai, P.-C. (1980) Nature 283, 433-438

134) Perlman, D., and Haovorson, H.O. (1983) J.Mol.Biol. 167, 391-409

135) Sabatini, D.D., Kreibich, G., Maimoto, T., and Adesnik, M. (1982) J.Cell.Biol. 92, 1-22

136) McConnell, J., Cordingley, J.S., and Turner, M.J. (1982) Mol.Biochem.Parasitol. 6, 161-174

137) McConnell, J., Gurnett, A.M., Cordingley, J.S., Walter, J.E., and Turner, M.J. (1981) Mol.Biochem.Parasitol. 4, 225-242

138) Auffret, C.A., and Turner, M.J. (1981) Biochem.J. 193, 647-650

139) Gurnett, A.M., Raper, J., and Turner, M.J. (1986) Mol. Biochem.Parasitol. 18, 141-153

140) Hall, T., and Esser, K. (1984) J.Immunol. 132, 2059-2063

141) Miler, E.N., Allan, L.M., and Turner, M.J. (1984) Mol.Biochem.Parasitol. 13, 309-322

142) Duvillier, G., Aubert, J.P., Baltz, T., Richet, C., and Digand, P. (1983) Biochem.Biophys.Res.Comm. 110, 491-498

143) Lalor, T.M., Kjeldgaard, M., Shimamoto, G.T., Strickler, J.E., Konigsberg, W.H., and Richards, F.F. (1984) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81, 998-1001

144) Cohen, C., Reinhardt, B., Parry, D.A.D., Radantz, G.E., Hirsch, W., and Konwe, B. (1984) Nature 311, 169-171

145) Freymann, D.M., Metcalf, P., Turner, M., and Wiley, D.C. (1984) Nature 311, 167-169

146) Jähnig, F., Bülow, R., Baltz, T., und Overath, P. (1987) FEBS Letters submitted

147) Bordier, C., Etges, R.J., Ward, J., Turner, M.J., und Cardoso De Almeida, M.C. (1986) Proc.Nat.Acad.Sci.USA 83, 5988-5991

148) Capdeville, Y. Baltz, T., Deregnaucourt, C. und Keller, A.-M. (1986) Exp.Cell Res. 167, 75-86

149) Low, M.G., und Zilversmith, D.B. (1980) Biochemistry 19, 3913-3918

150) Ikezawa, H., und Taguchi, R. (1981) Methods Enzymol. 71, 731-741

151) Tse, A.G.D., Barclay, A.N., Watts, A., und Williams, A.F. (1986) Science 230, 1003-1008

152) Low, M.G., und Kincade, P.W. (1986) Nature 318, 62-64

153) He, H.-T., Barbet, J., Chaise, J.-C., und Goridis, C. (1986) EMBO J. 5, 2489-2494

154) Davitz, M.A., Low, M.G., und Nussenzweig, V. (1986) J.Exp.Med. 163, 1150-1161

155) Futerman, A.H., Low, M.G., Michaelson, D.M., und Silman, J. (1985) j.Neurochem. 45, 1487-1494

156) Steiger, A., Cardoso De Almeida, M.C., Brodbeck, U., und Bordier, C. (1986) FEBS Lett. 199, 182-186

157) Saltiel, A.R., und Cuatrecasas, p.-(1986) Proc.Natl.Acad. Sci. USA 83, 5793-5797

158) Saltiel, A.R., Fox, J.A., Sherline, P., und Cuatrecasas, P. (1986) Science 233, 967-972

160) Russel, D.G., und Wilhelm, H. (1986) J.Immunol. 136, 2613-2620

161) Williams, A.F., und Gagnon, J. (1982) Science 216, 696-703

162) Williams, A.F. (1985) Nature 314, 579-580

163) Edelman, G.M. (1985) Annu.Rev.Biochem. 54, 135-169

164) Rutishauser, U., und Goridis, C. (1986) TIG 2, 72-76

165) Hoffman, E.M. (1969) Immunochemistry 6, 391

166) Nicholson-Weller, A., Burge, J., Fearon, D.T., Weller, P.F., und Austin, K.F. (1982) J.Immunol. 129, 184

167) Medof, M.E., Kinoshita, T., und Nussenzweig, V. (1984) J.Exp.Med. 160, 1558

168) Chang, H.-C., Moriuchi, T., Denome, P., Pliegh, H. und Silver, J. (1985) Science 227, 649-651

169) Gennarini, G., Hirn, M., Deagostini-Bazin, H., und Goridis, C. (1984) Eur.J.Biochem. 142, 65-73

170) Dragsten, P., Henkart, P., Blumenthal, R., Weinstein, J., und Schlessinger, J. (1979) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 76, 5163-5167

171) Bülow, R., Overath, O., und Davoust, J. (1987) EMBO J. submitted

172) Schlessinger, J., Webb, W.W., Elson, E.L., und Metger, H. (1976) Nature 264, 550-552

173) Schlessinger, J., Schechter, Y., Cuatrescasas, P., Willingham, M.C., und Pastan, J. (1978) Proc.Natl.Acad.Sci. USA 75, 5353-5357

174) Jacobson, K., Derzko, Z., Wu, E.-S., Hau, Y., und Paste, G. (1976) J.Supramol.Struct. 5, 565-576

175) Schlessinger, J., Axelrod, P., Koppel, D.E., Webb, W.W., und Elson, E.L. (1977) Science 195, 307-309

176) Edidin, M., Zagyansky, Y., und Lardner, T.J. (1976) Science 191, 466-468

177) Schlessinger, J., Elson, E.L., Webb, W.W., Yahara, J., Rutishauser, U., und Edelman, G.M. (1977) Proc.Natl.Acad. Sci. USA 74, 1110-1114

178) Peters, R. (1981) Cell Biol.Intern.Rep. 5, 733-760

179) Turner, M.J. (1982) Adv.Parasitol. 21, 69-153

180) Bowles, D.J., and Voorheis, H.P. (1982) FEBS Letters 139, 17-21

181) Jackson, D.G., Owen, M.J., and Voorheis, H.P. (1985) Biochem.J. 230, 195-202

182) Cardoso de Almeida, M.L., Allan, L.M., and Turner, M.J. (1984) J.Protozool. 31, 53-60

183) Black, S.J., Hewett, R.S., and Sendashonga, C.N. (1982) Parasite Immunol. 4, 233-244

184) Tizard, I., Nielson, K.H., Seed, J.R., and Hall, J.E. (1978) Microbiol.Rev. 42, 661-681

185) Jayawardena, A.N., and Waksman, B.H. (1977) Nature 265, 539-541

186) Baltz, T., Baltz, D., Giroud, C.H., and Crockett, J. (1985) EMBO J. 4: 1273-1277

187) Brun, R., Jenni, L., Schönenberger, M.,and Schell, K.-F. (1981) J.Protozool. 28, 470-479

188) Vogel, H.J., und Bonner, D.M. (1956) J.Biol.Chem. 218, 97-106

189) Van Merivenne, N., Magnus, E., und Jassens, P.G. (1976) Ann.Soc.Belge Med.Trop. 56, 55-63

190) Righetti, P.G., "Isoelectric Focusing: Theory, Methodology and Applications" 1983, Elsevier, New York

191) Overath, P., und Träuble, H. (1973) Biochemistry 12, 2625-2634

192) Walter, R.D., und Opperdoes, F.R. (1982) Mol.Biochem. Parasitol. 6, 287-295

193) Steiger, R.F., Opperdoes, F.R., und Bontemps, J. (1980) Eur.J.Biochem. 105, 163-175

194) Köhler, G., Howe, S.C., und Milstein, C. (1976) Eur.J. Immunol. 6, 292-295

195) Dreyer, C., Singer, H., and Hausen, P.C. (1981) Wilhelm Roux's Arch.Dev.Biol. 190, 197-207

196) Stanker, L.H., Vanderlaan, M., and Juarez-Salinas, H. (1985) J.Immunol.Methods 76, 157-169

197) Kessler, S.W. (1975) J.Immunol. 115, 1617-1624

198) Kessler, S.W. (1981) In "Methods of Enzymology" (J.J. Lanpone and H.Van Vunakis, eds.) Vol. 73, 442-459, Academic Press, New York

199) Holder, A.A., und Freeman, R.R. (1982) J.Exp.Med. 156, 1528-1538

200) Laemmli, U.K. (1970) Nature 227, 680-695

201) Wray, W., Boulikas, T., Wray, V.P., und Hancock, R. (1981) Anal.Biochem. 118, 197-203

202) Pluschke, P., und Overath, P. (1981) J.Biol.Chem.256, 3207-3212

203) Bligh, E.G., und Dyer, W.J. (1959) Can.J.Biochem. 37, 911-917

204) Read, S.M., und Northcote, D.H. (1981) Anal.Biochem. 116, 53-64

205) Bradford, M.M., (1976) Anal.Biochem. 72, 248-254

206) Wright, J.K., Schwarz, H., Straub, E., Overath, P., Bieseler, B., und Beyreuther, K. (1982) Eur.J.Biochem. 124, 545-552

207) Opperdoes,F.R.., und Steiger, R.F. (1981) Mol.Biochem. Parasitol. 4, 311-323

208) Opperdoes, F.R., und Borst, P. (1977) FEBS Lett. 80, 360-364

209) Ross, C.A., Cardoso de Almeida, M.L., and Turner, M.J. (1987) Mol.Biochem. Parasitol. 22, 153-158

210) Turner, M.J., (1984) Phil.Trans.R.Soc.Lon. B307, 27-40

211) Hereld, D., Krakow, J.L., Bangs, J.D., Hart, G.W., und Englund, P.T. (1986) J.Biol.Chem. 261, 13813-13819

212) Jackson, D.G., Owen, M.J., und Voorheis, H.P. (1985) Biochem.J. 230, 195-202

213) Fox, J.A., Duszenko, M., Ferguson, M.A.J., Low, M.G., und Cross, G.A.M. (1986) J.Biol.Chem. 261, 15767-15771

214) Medof, M.E., Walter, E.J., William, L.R., Haas, R., und Rosenberry, T.L. (1986) Biochemistry 25, 6740-6747

215) Ikezawa, H., und Taguchi, R. (1981) Methods Enzymol. 71, 731-741

216) Low, M.G. (1981) Methods Enzymology 71, 680-695

217) Op den Kamp, J.A.F. (1979) Annu.Rev.Biochem. 48, 47-71

218) Bangs, J.D., Andrews, N.W., Hart, G.W., und Englund, P.T. (1986) J.Cell.Biol. 103, 255-263

219) Diffley, P. (1984) J.Immunol. 131, 1983-1986

Lebenslauf

Roland Bülow

18. Dezember 1958	geboren in Bremen als Sohn des Dr.med. Hans-Arnim Bülow und der Dr.med. Gerda Bülow, geborene Lang
1965 - 1968	Besuch der Grundschule in Karlsruhe
1968 - 1977	Besuch des humanistischen Bismarck-Gymnasium in Karlsruhe, Abitur
1977 - 1979	Wehrdienst
1979 - 1981	Studium an der Universität Tübingen, Vordip
1981 - 1982	Studium an der University of Texas at Austi mit einem Fulbright Stipendium
1982	Rückkehr nach Tübingen
Mai 1983	Diplomprüfung
1983 - 1987	Diplomarbeit und Dissertation "Funktion und Eigenschaften der Glykophophatidylinositol-spezifischen Phospholipase C in Trypanosoma brucei" am Max-Planck-Institut für Biologie in Tübingen unter Anleitung von Prof. Dr. H Overath.

Meine akademischen Lehrer waren:

D. Ammermann, F.-W. Bentrup, V. Braun, K. Hantke, G. Jung,
W. Loeffler, R. Lorenz, H. Ninnemann, F. Oberwinkler, P. Overath,
K. Poralla, A. Rieker, U. Seitz, W. Seyffert, E.E. Snell,
D. Sperlich, A. Wörz, H. Zähner

Offsetdruck Spengler
Lessingstraße 4 · 7401 Neustetten 1
Telefon (0 74 72) 2 21 45